

JP 4501848

1/9/1

DIALOG(R)File 351: Derwent WPI

(c) 2007 The Thomson Corporation. All rights reserved.

0004818658 WPI Acc no: 1989-192552/198926

Related WPI Acc No: 1990-192953 XRAM Acc no: C1989-085222; C1990-083493

Inhibiting platelet-dependent arterial thrombosis - by admin. of D-phenyl-alanyl-prolyl-arginine halomethyl ketone cpds.

Patent Assignee: SCRIPPS CLINIC & RE (SCRI); SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)

Inventor: HANSON S R; HARKER L A

Patent Family (10 patents, 13 countries)							
Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
WO 1989005148	A	19890615	WO 1988US4210	A	19881123	198926	B
AU 198932864	A	19890705				198937	E
EP 343241	A	19891129	EP 1988903538	A	19881123	198948	E
US 4929602	A	19900529	US 1987125178	A	19871125	199025	E
			US 1988275330	A	19881122		
JP 4501848	W	19920402	JP 1989503265	A	19881123	199220	E
EP 343241	B1	19940216	WO 1988US4210	A	19881123	199407	E
			EP 1989903538	A	19881123		
DE 3887875	G	19940324	DE 3887875	A	19881123	199413	E
			WO 1988US4210	A	19881123		
			EP 1989903538	A	19881123		
EP 343241	A4	19910731	US 1988239761	A	19880902	199517	E
CA 1335075	C	19950404	CA 583982	A	19881124	199521	E
JP 2758953	B2	19980528	WO 1988US4210	A	19881123	199826	E
			JP 1989503265	A	19881123		

Priority Applications (no., kind, date): US 1987125178 A 19871125; US 1988275330 A 19881122

Patent Details						
Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes	
WO 1989005148	A	EN	65	8		
National Designated States,Original	AU JP					
Regional Designated States,Original	AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE					
EP 343241	A	EN				
Regional Designated States,Original	AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE					
US 4929602	A	EN	21	8		
JP 4501848	W	JA	16		Based on OPI patent	WO 1989005148
EP 343241	B1	EN	30		PCT Application	WO 1988US4210
					Based on OPI patent	WO 1989005148
Regional Designated States,Original	AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE					
DE 3887875	G	DE			PCT Application	WO 1988US4210
					Application	EP 1989903538
					Based on OPI patent	EP 343241
					Based on OPI patent	WO 1989005148
EP 343241	A4	EN				
CA 1335075	C	EN				
JP 2758953	B2	JA	19		PCT Application	WO 1988US4210
					Previously issued patent	JP 04501848
					Based on OPI patent	WO 1989005148

Alerting Abstract WO A

Method of inhibiting platelet-dependent arterial thrombosis comprises admin. of a peptide of formula (I) or hydrohalic acid addn salt. In (I), where Z = H or 1-6C acyl, pref H; and X = halogen, pref. Cl; i.e. D-Phe-Pro-Arg-haloalkyl ketone and N-acyl derivs.

USE/ADVANTAGE - Partic. useful for inhibiting post-therapeutic arterial restenosis and platelet deposition on prosthetic surfaces (both claimed), e.g. in endarterectomy or angioplasty or installation of arterial prostheses or arteriovenous shunts. Doses are such as to give a concn. of (I) of at least 0.2, pref. at least 1 mcg/ml in blood flowing in treated arteries or past the prosthetic surface, for a time of at least 5 min., pref. 5-90 min.

Diseases in which platelet dependent arterial thrombosis plays a role and which may be managed with (I) include cerebrovascular atherosclerotic disease (stroke or transient cerebral ischemia), coronary atherosclerotic disease (cardiac ischemia, unstable angina or acute myocordial infarction), and peripheral arterial occlusive disease (distal ischemia),

etc. (I) may be used in conjunction with a thrombolytic agent (urokinase, streptokinase, tPA).

Equivalent Alerting Abstract US A

Method of inhibiting platelet-dependent arterial thrombosis, arterial restenosis or platelet deposition on an arterial prosthetic surface comprises admin. of a peptide of formula (I) or hydrohalic acid addn. prods.; where Z = H or 1-6C acyl; and X = halogen. Pref. Z = H and X = Cl, i.e. D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl.

USE/ADVANTAGE - Useful in treatment of cerebrovascular atherosclerotic disease, e.g. stroke or transient cerebral ischemia, coronary atherosclerotic disease, e.g. cardiac ischemia, unstable angina or acute myocardial infarction, peripheral arterial occlusive disease, e.g. distal ischemia, etc. for inhibiting restenosis following e.g. endarterectomy, angioplasty, arterial vascular prosthesis insertion or treatment with thrombolytic agent (e.g. streptokinase, urokinase or tPA); and for inhibiting platelet deposition on arterial prostheses, e.g. grafts, arterial stens, A-V shunts, cardiopulmonary assist devices, etc. Doses are sufficient to give a concn. in the blood of at least 0.2, esp. at least 1 mcg/ml, pref. for at least 5 mins., esp. 5-90 mins.

Title Terms /Index Terms/Additional Words: INHIBIT; PLATELET; DEPEND; ARTERY; THROMBOSIS; ADMINISTER; PHENYL; ALANYL; PROLYL; ARGININE; HALOMETHYL; KETONE; COMPOUND

Class Codes

International Patent Classification					
IPC	Class Level	Scope	Position	Status	Version Date
A61K-037/02			Main		"Version 7"
A61K-037/02			Secondary		"Version 7"
A61K-0038/00	A	I	F	R	20060101
A61K-0038/06	A	I		R	20060101
A61K-0038/46	A	I	L	R	20060101
A61P-0007/02	A	I	L	R	20060101
A61P-0009/10	A	I	L	R	20060101
C07K-0005/08	A	I		R	20060101
A61K-0038/00	C	I	F	R	20060101
A61K-0038/06	C	I		R	20060101
A61K-0038/43	C	I	L	R	20060101
A61P-0007/00	C	I	L	R	20060101
A61P-0009/00	C	I	L	R	20060101
C07K-0005/00	C	I		R	20060101

US Classification, Issued: 514018000, 530331000

File Segment: CPI; EngPI

DWPI Class: B03; P34

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C01A; B07-D03; B12-C10; B12-F01B; B12-F02; B12-H02

Chemical Indexing

Chemical Fragment Codes (M2):

01 M903 M904 F011 F012 F423 G010 G100 H100 H181 H2 H211 H6 H600 H602 H603
H604 H681 J0 J012 J013 J3 J311 J371 J5 J581 K0 L2 L250 M210 M211 M212
M213 M214 M215 M231 M232 M233 M262 M280 M281 M311 M312 M314 M321 M332
M342 M343 M349 M362 M371 M381 M391 M413 M510 M521 M531 M540 M640 M650
M781 P448 P522 P523 P813 P814 8926-34901-U 129798-X 131652-X 131663-X
63-X 7-X 80-X 9-X

Generic (Markush) Compound Numbers: 8926-34901-U

Derwent Chemistry Resource Numbers: (Linked) 129798-X; 131652-X; 131663-X; 63-X; 7-X; 80-X; 9-X; 129798-REM; 131652-REM; 131663-REM; 63-REM; 7-REM; 80-REM; 9-REM

Key Word Indexing

1 129798-REM 131652-REM 131663-REM 63-REM 7-REM 80-REM 9-REM

Original Publication Data by Authority

Australia

Publication No. AU 198932864 A (Update 198937 E)

Publication Date: 19890705

Language: EN

Priority: US 1987125178 A 19871125

Current IPC: C07K-5/00(R,I,M,EP,20060101,20051206,C) C07K-5/08(R,I,M,EP,20060101,20051206,A)

Canada

Publication No. CA 1335075 C (Update 199521 E)

Publication Date: 19950404

Assignee: SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)

Inventor: HARKER L A

HANSON S R

Language: EN

Application: CA 583982 A 19881124 (Local application)

Priority: US 1987125178 A 19871125

US 1988275330 A 19881122

Original IPC: A61K-37/64(A) A61K-37/02(B) A61K-37/54(B) A61L-33/00(B)

Current IPC: A61K-38/00(R,A,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-

38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-

38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

Germany

Publication No. DE 3887875 G (Update 199413 E)
Publication Date: 19940324
Assignee: SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)
Inventor: HARKER L A
HANSON S R
Language: DE
Application: DE 3887875 A 19881123 (Local application)
WO 1988US4210 A 19881123 (PCT Application)
EP 1989903538 A 19881123 (Application)
Priority: US 1987125178 A 19871125
US 1988275330 A 19881122
Related Publication: EP 343241 A (Based on OPI patent)
WO 1989005148 A (Based on OPI patent)
Original IPC: A61K-37/02(A) C07K-5/08(B)
Current IPC: A61K-37/02(A) C07K-5/08(B)

EPO

Publication No. EP 343241 A (Update 198948 E)
Publication Date: 19891129
VERFAHREN ZUR VORBEUGUNG EINER VON BLUTPLATTCHEN ABHANGIGEN GEFASSTHROMBOSE
A METHOD OF INHIBITING PLATELET DEPENDENT ARTERIAL THROMBOSIS
PROCEDE INHIBANT LA THROMBOSE ARTERIELLE DUE AUX PLAQUETTES
Assignee: SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla California 92037, US (SCRI)
Inventor: HARKER, Laurence, A., 3498 Lady Hill Road, San Diego, CA 92130, US
HANSON, Stephen, R., 201 Meadow Vista Lane, Encinitas, CA 92024, US
Agent: Fisher, Adrian John et al, CARPMAELS & RANSFORD 43 Bloomsbury Square, London WC1A 2RA, GB
Language: EN
Application: EP 1988903538 A 19881123 (Local application)
Priority: US 1987125178 A 19871125
Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE
Original IPC: A61K-37/02 C07K-5/08
Current IPC: A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-

38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-
38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)
A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-
38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-
7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)
A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-
9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

Original Abstract:

The present invention contemplates a method of preventing platelet dependent arterial thrombosis using a halogen-methyl ketone-containing peptide represented by formula (I), or a hydrohalic addition product thereof. More particularly, the present invention provides improved methods for inhibiting arterial restenosis, hemodialysis and the like.

Claim: Method of inhibiting platelet-dependent arterial thrombosis comprises admin. of a peptide of formula (I) or hydrohalic acid addn salt. In (I), where Z = H or 1-6C acyl, pref H; and X = halogen, pref. Cl; i.e. D-Phe-Pro-Arg-haloalkyl ketone and N-acyl derivs.

Publication No. EP 343241 A4 (Update 199517 E)

Publication Date: 19910731

Assignee: SCRIPPS CLINIC & RE (SCRI)

Inventor: HARKER L A

HANSON S R

Language: EN

Application: EP 1988903538 A 19881123 (Local application)

Original IPC: A61K-37/02(B) C07K-5/08(B)

Current IPC: A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-

38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-

38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-

38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-

7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-

9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

Publication No. EP 343241 B1 (Update 199407 E)

Publication Date: 19940216

**VERFAHREN ZUR VORBEUGUNG EINER VON BLUTPLATTCHEN
ABHANGIGEN GEFASSTHROMBOSE**

**A METHOD OF INHIBITING PLATELET DEPENDENT ARTERIAL
THROMBOSIS**

**PROCEDE INHIBANT LA THROMBOSE ARTERIELLE DUE AUX
PLAQUETTES**

Assignee: SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, 10666 North Torrey
Pines Road, La Jolla California 92037, US (SCRI)

Inventor: HARKER, Laurence, A., 3498 Lady Hill Road, San Diego, CA 92130, US

HANSON, Stephen, R., 201 Meadow Vista Lane, Encinitas, CA 92024, US

Agent: Fisher, Adrian John et al, CARPMAELS & RANSFORD 43 Bloomsbury Square,
London WC1A 2RA, GB

Language: EN (30 pages)

Application: WO 1988US4210 A 19881123 (PCT Application)

EP 1989903538 A 19881123 (Local application)

Priority: US 1987125178 A 19871125

US 1988275330 A 19881122

Related Publication: WO 1989005148 A (Based on OPI patent)

Designated States: (Regional Original) AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

Original IPC: A61K-37/02(A) C07K-5/08(B)

Current IPC: A61K-38/00(R,A,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-

38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-

38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-

38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-

7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-

9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

Claim:

- 1. Die Verwendung des Peptides der Formel 1,[0060.0001]
worin Z Wasserstoff oder eine C₁-C₆-Acylgruppe und X ein Halogenatom
darstellt, oder eines Additionsprodukts davon mit einer Halogenwasserstoffsäure
zur Herstellung eines Medikaments zum Hemmen von Blutplättchen-
abhängiger Thrombusbildung, Arterienverengung oder Blutplättchenablagerung
auf einem prothetischen Gegenstand.
- 1. The use of a peptide of Formula 1[0056.0001]
wherein Z is hydrogen or a C₁-C₆ acyl and X is a halogen atom, or a hydrohalic
acid addition product thereof, in the manufacture of a medicament for inhibiting
platelet dependent arterial thrombosis, arterial restenosis or platelet deposition on
an arterial prosthetic device.

Japan

Publication No. JP 4501848 W (Update 199220 E)

Publication Date: 19920402

Assignee: SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)

Language: JA (16 pages)

Application: JP 1989503265 A 19881123 (Local application)

Priority: US 1987125178 A 19871125

Related Publication: WO 1989005148 A (Based on OPI patent)

Original IPC: A61K-37/02(B)

Current IPC: A61K-37/02(B)

Publication No. JP 2758953 B2 (Update 199826 E)

Publication Date: 19980528
Assignee: SCRIPPS CLINIC & RES FOUND (SCRI)
Inventor: HARKER L A
HANSON S R
Language: JA (19 pages)
Application: WO 1988US4210 A 19881123 (PCT Application)
JP 1989503265 A 19881123 (Local application)
Priority: US 1987125178 A 19871125
US 1988275330 A 19881122
Related Publication: JP 04501848 A (Previously issued patent)
WO 1989005148 A (Based on OPI patent)
Original IPC: A61K-38/00(A) A61K-38/46(B)
Current IPC: A61K-38/00(R,A,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-
38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-
38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)
A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-
38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-
7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)
A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20050101,C,L) A61P-
9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

United States

Publication No. US 4929602 A (Update 199025 E)
Publication Date: 19900529
Method of inhibiting platelet dependent arterial thrombosis
Assignee: Scripps Clinic and Research Foundation (SCRI)
Inventor: Harker, Laurence A., CA, US
Hanson, Stephen R.
Agent: Dressler, Goldsmith, Shore, Sutker & Milnamow, Ltd.
Language: EN (21 pages, 8 drawings)
Application: US 1987125178 A 19871125
US 1988275330 A 19881122 (Local application)
Original IPC: A61K-37/02 C07K-5/08
Current IPC: A61K-37/02 C07K-5/08
Original US Class (main): 51418
Original US Class (secondary): 530331
Original Abstract:
The present invention contemplates a method of preventing platelet dependent arterial thrombosis using a halogen-methyl ketone-containing peptide represented by Formula (1) as shown in FIG. 1, or a hydrohalic addition product thereof. More particularly, the present invention provides improved methods for inhibiting arterial restenosis, hemodialysis and the like.

WIPO

Publication No. WO 1989005148 A (Update 198926 B)

Publication Date: 19890615

A METHOD OF INHIBITING PLATELET DEPENDENT ARTERIAL THROMBOSIS

Assignee: SCRIPPS CLINIC AND RESEARCH FOUNDATION, US (SCRI)

Inventor: HARKER, LAURENCE, A., US

HANSON, STEPHEN, R., US

Language: EN (65 pages, 8 drawings)

Application: WO 1988US4210 A 19881123 (Local application)

Priority: US 1987125178 A 19871125

US 1988275330 A 19881122

Designated States: (National Original) AU JP

(Regional Original) AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

Original IPC: A61K-37/02 C07K-5/08

Current IPC: A61K-38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,F) A61K-

38/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,F) A61K-

38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,A) A61K-38/06(R,I,M,EP,20060101,20051008,C)

A61K-38/43(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61K-

38/46(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L) A61P-

7/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-7/02(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

A61P-9/00(R,I,M,JP,20060101,20051220,C,L) A61P-

9/10(R,I,M,JP,20060101,20051220,A,L)

Original Abstract:

The present invention contemplates a method of preventing platelet dependent arterial thrombosis using a halogen-methyl ketone-containing peptide represented by formula (I), or a hydrohalic addition product thereof. More particularly, the present invention provides improved methods for inhibiting arterial restenosis, hemodialysis and the like.

⑬ 公表 平成4年(1992)4月2日

⑭ Int. Cl.⁵A 61 K 37/02
37/54

識別記号

ABX
ACB

庁内整理番号

8317-4C
8317-4C

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

(全16頁)

⑮ 発明の名称 血小板依存性動脈血栓症の予防方法

⑯ 特 願 平1-503265

⑰ 出 願 昭63(1988)11月23日

⑱ 翻訳文提出日 平1(1989)7月25日

⑲ 国際出願 PCT/US88/04210

⑳ 国際公開番号 WO89/05148

㉑ 国際公開日 平1(1989)6月15日

優先権主張 ㉒ 1987年11月25日 ㉓ 米国(US) ㉔ 125,178

⑳ 発 明 者 ハーカー ローレンス エイ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92130 サン デイエゴ レ
ディー ヒル ロード 3498㉑ 出 願 人 スクリップス クリニック ア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース
ンド リサーチ ファウンダー トーリー バインズ ロード 10666
シヨン

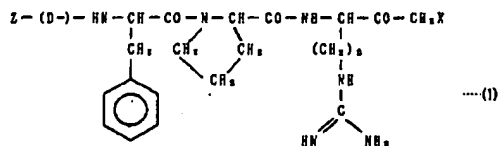
㉒ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外7名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特
許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

(1) 患者における血小板依存性動脈血栓症を予防する方法において、該患者に対する治療上有効な量の式1で表わされるペプチド又はそのハロゲン酸付加生成物の投与を含む方法



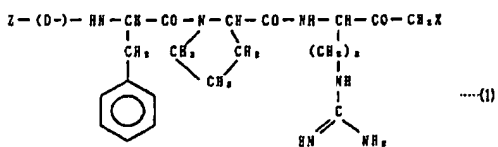
(式中、Zは水素若しくはC₁-C₈アシル基を示し；

Xはハロゲン原子を示す)。

(2) 請求の範囲第1項記載の方法において、Xが塩素を示し、Zが水素を示す方法。

(3) 患者における動脈再狭窄症を予防する方法において、以下の(a)、(b)及び(c)：

(a) 該患者に対する治療上有効な量の式(1)で表わされるペプチド又はそのハロゲン酸付加生成物の投与



(式中、Zは水素若しくはC₁-C₈アシル基を示し；

Xはハロゲン原子を示す)。

(b) 該患者に対する狭窄動脈内の血液管直径を増大させ、それ

により処置動脈を作成するための医療処置の実施、及び

(c) 該患者の動脈血の該処置動脈中の循環

を含む方法。

(4) 請求の範囲第3項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも0.2 μg / mlの該血中ペプチド濃度をもたらすのに十分である方法。

(5) 請求の範囲第3項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも1 μg / mlの該血中ペプチド濃度をもたらすのに十分である方法。

(6) 請求の範囲第5項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも5分間該ペプチド濃度を維持するのに十分である方法。

(7) 請求の範囲第5項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも5分間以上で90分間以下の間該血中濃度を維持するのに十分である方法。

(8) 請求の範囲第3項記載の方法において、Xが塩素を示し、Zが水素を示す方法。

(9) 請求の範囲第3項記載の方法において、該医療処置が外科処置である方法。

(10) 請求の範囲第9項記載の方法において、該外科処置が動脈内腔切開術若しくは血管形成術である方法。

(11) 請求の範囲第3項記載の方法において、該医療処置が該患者に対する医療上有効な量の血栓溶解剤の投与を含む方法。

(12) 請求の範囲第11項記載の方法において、該血栓溶解剤がストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ若しくは組織プラスミノゲン活性化剤である方法。

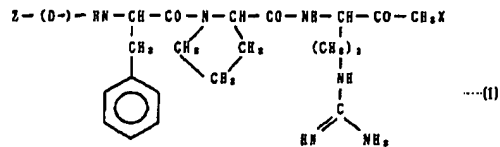
(13) 請求の範囲第3項記載の方法において、(a)が(c)より先に行なわれる方法。

00 請求の範囲第18項記載の方法において、該血中の該ペプチド濃度が少なくとも $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間に(4)が行なわれる方法。

05 請求の範囲第13項記載の方法において、(4)が行なわれた後5分以内に(4)が行なわれる方法。

06 患者における動脈補綴表面の血小板沈着を予防する方法において、以下の(a)及び(b)：

(a) 該患者に対する治療上有効な量の式(I)で表わされるペプチド及びそのハロゲン酸付加生成物の投与



(式中、Zは水素若しくは C_1-C_6 アルキル基を示し；

Xはハロゲン原子を示す)。

(b) 該患者の動脈血の補綴表面上の循環を含む方法。

07 請求の範囲第16項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の該血中ペプチド濃度をもたらすのに十分である方法。

08 請求の範囲第16項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の該血中ペプチド濃度をもたらすのに十分である方法。

09 請求の範囲第18項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも5分間該ペプチド濃度を維持するのに十分である方法。

血小板依存性動脈血栓症の予防方法

明 細 書

参照関連文献

本件は、その開示が参考文献として本文中に組み込まれている、1987年11月27日出願に係る第125,178号の一部係属出願である。

技術分野

本発明は動脈血栓症の危険のある患者における血小板凝集を予防するためのハロゲン-メチルケトン含有ペプチドの使用に関する。

発明の背景

血栓は血栓形成性刺激への反応として生きた心臓若しくは血管中に血液構成要素から形成される成分の集合体である。

血栓症、すなわち血栓形成過程は独特であるが通常相互作用的なメカニズムを通じて発生しうる。第一段階、すなわち血小板凝集は血小板が血管壁損傷等の血栓形成性刺激により活性化された結果として起きる。第二段階、すなわちフィブリン形成は凝集連鎖系の活性化の結果であり、その最終段階が通常トロンビンによるフィブリノーゲンのフィブリンへの転化、すなわちフィブリン形成と考えられている。フィブリン形成の目的は凝集血小板を安定化させることにより止血プラグ(Plug)を安定化させることであると思われる。

血小板凝集及びフィブリン形成の関与の強度若しくは程度は、血行力学(血流)因子の結果として変化することが今では知られている。たとえば、静脈血栓症は低流速条件下で発生し、血小板及び凝集連鎖成分の会合かつ等量の消費を伴うことが示されている(ハーカーら、ニューイングランド ジャーナル オブ

請求の範囲第18項記載の方法において、該ペプチドの量が少なくとも5分間以上で90分以下の間該血中濃度を維持するのに十分である方法。

(21) 請求の範囲第15項記載の方法において、Xが塩素を示し、Zが水素を示す方法。

(22) 請求の範囲第16項記載の方法において、該血栓形成性表面が動脈補綴若しくは動脈吻合である方法。

(23) 請求の範囲第16項記載の方法において、(a)が(b)より先に行なわれる方法。

(24) 請求の範囲第23項記載の方法において、該血中の該ペプチド濃度が少なくとも $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間に(4)が行なわれる方法。

メディシン、287巻、第999-1005頁、1972年)。結果として、静脈血栓は通常比較的小数の凝集血小板、多量の散在フィブリン及び幾つかの赤血球細胞から成る非組織化塊であり、このため「赤色血栓」と呼ばれる。フライマン「止血と血栓症」：基本原理と臨床的実践、コールマンら編、第2版、フィラデルフィア、J. B. リッピンコット社、第1123-35頁(1987年)を参照のこと。これらの観察はフィブリン形成が静脈血栓の発生において主役を演じることを示唆している。

対照的に、動脈血栓症は高流速条件下で発生し、少なくともその初期の段階で、血小板の選択的消費を伴うことが示されている(ハーカーら、ニューイングランドジャーナル オブ メディシン、287巻、第999-1005頁、1972年)。例として、動物実験はプラスチック動脈カニューレの補綴表面は完全に血小板だけから成る血栓を発生させ、その血栓形成過程は検出可能な凝集連鎖系の関与なしに進行することを示している(エバンスら、ジャーナル オブ エクスペリメンタルメディシン、128巻、第877-894頁、1968年、及びハーカーら、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション、第64巻、第559-569頁、1979年)。おそらく、凝集作用が十分に活性化される前にトロンビン等の凝集促進物質が急速な動脈血流によって血栓形成焦点から洗い流されてしまうために、動脈血栓症においてはフィブリン形成は極少量である。結果として、動脈血栓は通常、完全に血小板だけから成る(「白色血栓」)か、若しくは血小板による基底あるいは一次塊及び、一次塊上を覆いそこから下流方向へ伸張する血小板及びフィブリンによる二次塊から成る複合構造から成る。前述のフライマンの引用文献を参照のこと。いずれの場合も、損傷部における血小板凝集は動脈

血栓発現の主要なメカニズムである。それゆえ、動脈血栓症は少なくともその初期の段階では、血小板依存性と特徴付けることができる（ハーカーら、"尿管系疾患：最新の研究と臨床応用" ストランドス編、オーランド、グラシ アンド ストラットン、第211-283頁、1987年）。

前述の観点から、血小板凝集若しくはフィブリン形成のいずれかに作用する薬剤の治療上の有効性が処置される血栓症の型に依存することが知られているのは驚くべきことではない。

例えば、アスピリン若しくはジピリダモール等の血小板凝集を阻害する、すなわち血小板の凝集能を阻害する薬剤は、動脈血栓症の予防において有効であるが、うっ血性静脈血栓症の治療においては有効でない。逆に、ヘパリン及びヒルジンの等のトロンビンのフィブリン形成能を阻害する薬剤は、うっ血性静脈血栓症に対しては治療上有効であるが、動脈血栓症に対しては有効でないことが示されている（ハーカーら、トロンボス アンド ダイアセティック ヘモリジ (Throm. Diath. Haemorrh.) 31巻、第188-203頁、1974年）。

このように、本技術分野は動脈血栓症の効果的な管理においては、フィブリン形成ではなく血小板凝集の調節に力点が置かれるべきであることを教えるものである。すなわち、血小板依存性動脈血栓症を治療上有効に予防するには、前述のフィブリン形成を阻害する薬剤（抗凝剤）ではなく、血小板の凝集能を阻害する薬剤（血小板凝集阻害剤）の投与が必要である。理想的には、臨床上有用な血小板凝集阻害剤は毒性がなく、持続性作用を持ち、異常出血の過剰リスクなしに良好な抗血栓作用をもつべきである。現在使用できる臨床薬剤のいずれも、これらの要求のすべてを満足してはいない。アスピリン、スルフィンピラゾン、ジピリダモ

ール、スロクチジル及びチクロピジンが現在までに臨床試験による評価を受けている薬剤である。

血小板依存性動脈血栓症を予防する能力のある薬剤の開発における困難のひとつは、アデノシン二リン酸 (ADP)、コラーゲン、トロンビン、トロンボキササンA、エピネフリン、セロトニン、バソプレシン、抗原-抗体複合体、プラスミン、ウイルス、バクテリア、エンドトキシン及び癌細胞を含む多様な刺激によって血小板の凝集が誘導されうることである。本技術分野によれば、インビボ (in vivo) ではいかなる単独の刺激剤の局所濃度もおそらく凝集を発生させるのに十分なほど高くないらしい。結果として、インビボでは、いくつかの刺激が共同作用的效果を伴って同時に血小板に作用するため、その刺激の個々については非常に低濃度で凝集の誘導に対して有効であるらしい。バックム、トロンボシス アンド ヘモスタシス (Thromb. Haemostas.) 50巻、第610-619頁 (1983年) を参照のこと。

このように、本技術分野では特定の血小板凝集誘導刺激を抑えることが、血小板依存性動脈血栓症の予防に対する有効なアプローチにならないと思われることを示唆されている。いくつかの研究が、この視点を支持しており、そのうち最も関連のあるものはトロンビンの酵素活性ではなく、トロンビンの体液活性、すなわちその血小板活性化刺激能を調べた研究である。たとえば、既知の抗凝剤であるヘパリン及びヒルジンはインビトロ (in vitro) でトロンビンの血小板凝集刺激能を阻害することも示されている（マークワードら、ヘモスタシス、13巻、第227-233頁、1983年、及びホフマンら、ヘモスタシス、14巻、第164-169頁、1984年）。もっとも、ヘパリン若しくはヒルジンのいずれもインビボでの動脈血栓症の予防においては

有効でなく、このことはトロンビン以外の1個以上の刺激がインビボの動脈内血小板凝集の誘導の原因であることを示唆している。

本発明で特に重要性を持つものは、D-フェニルアラニル-L-プロリン-L-アルギニル-クロロメチルケトン (D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl 若しくはPPACK) であるトリペプチド誘導体である（ケトナーら、トロンボシス リサーチ (Thromb. Res.)、14巻、第969-973頁、1979年、及び米国特許第4,318,904号、1982年3月9日、ショーら）。PPACKはトロンビンの酵素活性を、その活性部位付近のヒスチジン残基をヘパリン-抗トロンビンII複合体及びトロンビン間のそれと同等の遮断定数 (1.1×10^4 L/モル/秒) でアルキル化することにより、非可逆的に阻害する。

ヘパリン及びヒルジンと同様に、PPACKはインビボでトロンビンの、血漿フィブリノーゲンをフィブリンに転化し、それにより、赤血球の形成を誘導する能力を阻害することが示されている。ケトナーら、トロンボシス リサーチ、14巻、第969-973頁、1979年、参照のこと。しかしながら、引用した各実験に記されているような注射によりもたらされる局所的に非常に高い濃度のトロンビンは、いかなる自然の血栓症過程においてもおそらく発生しないことは結記しておくべきである。さらに、それらの実験の方法論は、報告されている実験条件下での血栓症の発生におけるトロンビンの酵素活性及び体液活性の相対的寄与を描き写さない。このように、それらの実験は、PPACKの動脈血栓症に及ぼす影響についての結論を引き出すのに適当なモデルを用いていなかった。

PPACKのフィブリン形成を予防する能力は、ヒトの血漿中及び実験動物の血液中に急速に滅滅することが示されている。た

えば、コレンら、ジャーナル オブ ラボラトリー アンド クリニカルメディスン、99巻、第76-83頁、1982年、はウサギにおけるPPACKのフィブリン形成阻害能の半減期は約2.9分であると報告した。ハウプトマンら、トロンボシスリサーチ、20巻、第347-351頁、1980年、も同様に参照のこと。

ウサギの血漿におけるPPACKのフィブリン形成阻害能の半減期が相対的に短いため、前述のコレンらはPPACKの抗凝血効果をより長い期間持続させるには連続的注入が必要であろうと結論した。さらに、コレンらはPPACKの短かい血漿半減期から、PPACKは散在性血管内凝血が展われるある種の緊急条件において特に有効と思われることを示唆するに至った。彼らの推論は、PPACKの単回注射はただちにトロンビンの酵素活性を阻害するらしいが、そのフィブリン形成阻害能は急速に滅滅するらしいため長期間の抗凝血効果はもたらされないであろう、というものであった。

マークワード、アニュアル ニューヨーク アカデミック サイエンス、685巻、第204-214頁、1986年、はPPACKの相対的に短かい半減期はそれがトロンビンだけでなく、アミノ基若しくはチオール基を含有する他の血液及び組織成分とも安定な共有結合を形成することができるためであると報告している。マークワードによれば、その性質がPPACKを抗凝血剤としてのインビボでの使用に不適当たらしめている。ハウプトマンら、トロンボシスリサーチ、20巻、第347-351頁、1980年、も参照のこと。

インビトロでのヘパリン様抗凝血剤としてのPPACKの使用の記述については、モラーら、トロンボシス アンド ヘモス

タシス (Thromb. Haemostas.)、56巻、第160-164頁、1986年；ボウドら、ボックス サンディモーター (Vox Sang.)、51巻、第192-196頁、1986年；チーフエンブルンら、サーキュレーション、73巻、第1291-1299頁、(1986年)；ク (Ku)、ジャーナル オブ カルディアック ファーマコロジー (J. Car. Pharm.)、8巻、第29-36頁、1986年；オフォスら、アニュアル ニューヨーク アカデミック サイエンス、485巻、第41-55頁、1986年；及びスカーファラ、ジャーナル オブ ラボラトリー アンド クリニカル メディシン、107巻、第488-497頁、1986年、を参照のこと。

またヘパリン及びヒルジンと同様に、PPACKはインビトロでトロンビンの血小板活性化刺激能を阻害することが示されている。ハーモンら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、261巻、第15928-33頁、1986年；ハーモンら、アニュアル ニューヨーク アカデミック サイエンス、485巻、第387-395頁、1986年；及びマークワードら、ヘモスタシス、13巻、第228-233頁、1983年、を参照のこと。もっとも、それらの各実験はクエン酸処理した血小板を人工培地中で使用して行なわれた。バックム、トロンボシス アンド ヘモスタシス (Thromb. Haemostas.)、50巻、第810-819頁、1983年、によればそのような培地中におけるヒト血小板の反応は生理的濃度のイオン化カルシウムが存在する培地中におけるそれとは異なる。このように、バックムによれば、血小板機能阻害剤についての多くの実験は実はイオン化カルシウムが低濃度の培地中における間隔の詰まった血小板の接触により起る。アラキドン酸経路の人工的刺激に対する阻害につ

いての実験であった。PPACKのインビトロでの血小板凝集阻害能についての実験から結論を引き出すことは、それゆえ困難である。

現在までインビボでの血小板凝集に対するPPACKの作用若しくはその動脈血栓症予防能についての研究はなされていない。このことは、トロンビンの酵素活性だけでなく、その血小板凝集刺激能も阻害するヘパリン等の薬剤が動脈血栓症の予防においては有効でないという上記考案の教訓の見地からすれば驚くに値しない。

本発明の簡単な要約

本発明は患者における血小板依存性動脈血栓症を予防する方法において、該患者に治療上有効な量の式(1)のペプチドを投与することを含む方法に関する。

他の態様においては、本発明は患者における治療後動脈再狭窄症を予防する方法で、該患者に治療上有効な量の式(1)のペプチドを投与すること、該患者に狭窄した動脈中の血流管腔径を増大させ処置動脈を作成するための治療過程を施すこと、及び該患者の動脈血を該処置動脈中に循環させることを含む方法に関する。

本発明はまた患者の補綴表面における血小板沈着を予防する方法で、該患者に治療上有効な量の式(1)のペプチドを投与すること、及び該患者の動脈血を補綴表面上に循環させることを含む方法に関する。

図面の簡単な説明

本開示の一部をなす図面において；

第1図は式(1)、すなわちハロゲン-メチルケトン含有ペプチドを表す式において、式中Xがハロゲン原子、好ましくは塩素若しくは臭素を示し、Zが水素若しくはC₁-C₄アルキル基、好

ましくは水素を示す式を具体的に表わしている。記号(D-)は該フェニルアラニン残基が右旋性であることを示しており、一方該プロリン及びアルギニン残基は両方とも左旋性の配置を持つ。

第2図は式(2)、すなわち式(1)において式中Xが塩素を示しZが水素を示す、好ましいハロゲン-メチルケトン含有ペプチドであるPPACKの式を具体的に表わしている。

第3図は、ヒビにおける動脈移植片上への血小板沈着を阻害する能力についてPPACKとヘパリンを比較した実験を具体的に表わした2パネルを含んでいる。

これらの実験では自己由来の血小板を¹¹¹I-ノオキシドでラベルした。その後長さ5mmの内径4.0mmのニットのダクロン血管移植片(V. S. ガーテル社からの寄贈品)を長期体外転位の大腸動脈シラスティックシャント(吻合)中に移植片として挿入した。該シャント内の血流量をカフ(cuff)ドブラー変換器針を用いて測定し、175±15ml/分の平均値を得た。血管移植片上の¹¹¹I-血小板沈着を映像分析システム(医療データシステムA、メドトロニック)と連結したガンマカメラ映像装置(ダイナカメラ、ピッカー社)によって測定した。結果は、沈着した血小板の放射能を1mlあたりの循環血液の放射能で割り、1mlあたりの循環血小板数を算出することにより得られる総沈着血小板で表わした。該測定図数は捨断内に示しており、垂直棒線は平均値±1標準偏差(one standard deviation)を表示している。

パネルAは非薬剤処置の対照動物において、¹¹¹I-血小板が急速にダクロン血管移植片に沈着し、50分後までに約10¹⁰血小板のプラトー(安定期)値に達したことを具体的に示している。該移植片は1.2±0.2時間で閉塞した。水平方向の斜線棒で示される60分間の100nsol/kg/分の速度でのPPACKの

連続的静脈内注入は血小板沈着を十分に阻害し、移植片の閉塞を予防した。血小板依存性動脈血栓形成の回復は、移植片座標上の約90分の位置より後の血小板沈着の増加によって明らかのように、PPACK投与停止の30分後に発現する。

パネルBは、該ヒビに体重1キログラム(kg)あたり100ユニット(V)のヘパリン投与(総血液凝固時間を3倍遅延させる用量)が、80分間の沈着実験時間にわたって該移植片上への血小板沈着を有意には減少させなかったことを具体的に表わしている。パネルBはまた該ヒビへの1000ユニット/kgの投与が該移植片上の血小板沈着を極一部しか阻害しなかったことを具体的に表わしている。

第4図は動脈内膜切除部位におけるPPACKの動脈再狭窄(¹¹¹I-血小板沈着)阻害能を具体的に表わしている。垂直棒線は平均値±1標準偏差を表示している。非薬剤処置の対照実験(●)における、該処置動脈内の動脈循環の開始後90分間の急性血小板沈着をパネルAに示す。パネルAに示された値は移植片標準値を用いて組織特性について補正されるため、該結果は沈着血小板数で表わされている。

PPACK(O)を該処置動脈内の動脈血循環を開始する直前から100nsol/kg/分の速度で静脈内投与した際に得られた結果もパネルAに示す。

パネルBでは、該動脈内膜切除部位の¹¹¹I-血小板沈着を実施例1に記述した方法で得た動脈内膜切除/血液比で表わしている。パネルBより、対照(●)及びPPACK処置(O)条件下の両方で¹¹¹I-血小板の蓄積的な蓄積は極少なかったことがわかる。

第5図は、ヘパリン(●)と比較してPPACK(O)の、血

血小板着の結果としての血液透析器内の容量損失若しくは該透析器の補綴表面における容量損失を防ぐ能力を具体的に表わしている。垂直線は平均値±1標準偏差を表示している。

第6図は動脈内膜切除処置を具体的に表わしている。該動脈をクランプで締めつけた後、遠位を横に切開する。該近位断片を曲ピンセットで逆に引っぱって裏返す。固定縫合を付け、マイクロソージャー法を用いて1cmの区間に内膜切除術を施す。該血管をその通常の配置に戻し、末端-末端吻合術を施す。正常内膜の断片が該内膜切除部位と吻合部位の間に介在する。

第7図はPPACKの動脈内膜切除部位での血小板着阻害能を具体的に表わす2パネルを含む。非薬剤処置動物では動脈内膜切除部位への血小板着は急速に増加し、60-90分でプラトーに達する。100nmol/kg PPACKの60分間静脈内注入の処置をうけた動物では、血小板着は著しく減少する。本作用は先の術後即時(左)及び、血小板内膜切除対血液比から明らかなように9日間を通じて(右)観察される。垂直線は平均値付近の分散を±1標準偏差で表示している。該対照と処置群の間の比較は両側学生t検定で行なった。

第8図は第5図と同様にヘパリンと比較した際の、該透析器内の血栓形成に対する各使用後の別個の測定値により、繊維束(血液透析器)中の容量損失及び 111In -血小板着を阻害するPPACKの能力を具体的に表わしている。ヘパリン処置動物は全試験時間において、有意かつ漸進的なDFVの損失及び繊維束内の血小板蓄積の相反的增加を示した。対照するに、該PPACK処置はDFVを保ち、透析器中の血小板蓄積を著しく減少させた。

本発明の詳細な説明

C、-C。アシル基を示し、Xはハロゲン原子を示す)で表わされるハロゲン-メチルケトン含有ペプチド及びそのハロゲン置換生成物についての新規使用法に関する。

好ましいハロゲン-メチルケトン含有ペプチドは図2で示される式(2)(式中、Zは水素を示し、Xは塩素を示す)で表わされ、ここではPPACKと呼ぶ。

ハロゲン原子には好ましくは塩素、炭素若しくはヨウ素を含む。

式(1)で表わされるハロゲン-メチルケトン含有ペプチドの合成及びトロンビンの酵素活性を押さえるためのその使用は米国特許第4,318,904号、1982年3月9日、ジョーら、に記載されており、その開示は参考文献としてここに組み込まれている。

式(1)のペプチドにより表わされるペプチドについての該新規使用法は、該ペプチドが動脈内損傷上への血小板着を有意に阻害し、それにより血小板依存性動脈血栓症の危険性を減少させるという発見から生まれた。

このように、本発明は患者における血小板依存性動脈血栓症を予防する方法で、該患者に治療上有効な量の式(1)のペプチド、好ましくはPPACKを投与することを含む方法に関する。

式(1)のペプチドに関して使用される“治療上有効な量”という句は、該被験者のトロンビン時間を最低約2倍、好ましくは最低約5倍、より好ましくは最低約10倍延長させるに十分なペプチド量を言う。本発明の好ましい態様においては、式(1)のペプチドは血漿中のペプチド濃度が最低約0.2マイクログラム/ミリリットル($\mu\text{g}/\text{ml}$)、好ましくは最低約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは最低約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に達するに十分な量を投与される。治療上有効な量の式(1)のペプチドの通常投与は血漿中のペプチド濃度が、約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは約

A. 定義

“血管形成術”は狭められた(狭窄した)動脈血管の外科的再構築を言う。“経皮的管腔外血管形成術”は風船カテーテルによる動脈血管の拡張であり、該風船カテーテルは皮膚を通して選択された血管中に挿入され、その後血管の管腔を遡って狭窄病変部位に達し、そこで該風船を動脈壁に対する平らなプラグになるまで膨らまし、それにより患部動脈内に流路を再設置する。

“抗凝血剤”は凝血を妨害し、それによりフィブリン形成を阻害する薬剤を言う。

“動脈内損傷”は循環中に動脈血が触れる血栓形成表面を言う。通常の動脈内損傷は動脈壁の内皮剥離領域、非内皮処理補綴装置などである。

“動脈内補綴装置”は、動脈血を受けて輸送するように尿管構造内に挿入される生物由来若しくは合成血管補綴を言う。

“凝血”は血液の多数の凝血因子が相互作用し、その結果フィブリンを形成する連続過程を言う。

“動脈内膜切除術”は動脈の厚化被アテローム内膜の切除を言う。“ガス動脈内膜切除術”は、アテローム性動脈硬化症の治療において心臓血管からプラグ状血栓を除去するために高圧二酸化炭素を利用して行なう動脈内膜切除術を言う。“レーザー動脈内膜切除術”はアテローム性動脈硬化血栓を除去するために、カテーテル指向性レーザーを利用して行なう動脈内膜切除術を言う。

種々の文法上の形態における“式(1)のペプチド”は第1図に示す式(1)により表わされるペプチド及びそのハロゲン置換生成物を言う。

B. 治療方法

本発明は第1図で示される式(1)(式中、Zは水素若しくは

0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲である。すなわち、上記の血漿濃度の式(1)のペプチドを含有する循環血液が血小板依存性動脈血栓症を予防する方法を提供する。

該血漿中の式(1)のペプチドの濃度測定法は本技術分野において周知であり、好ましい方法が、コレンら、ジャーナル オブ ラボラトリィ アンド クリニカル メディシン、99巻、第76-83頁、1982年に記述されており、その開示は参考文献としてここに組み込まれている。

患者(ヒト被験者)における血小板依存性動脈血栓症の存在を診断する方法は、本技術分野において周知である。それらの方法には、コントラスト血管造影法、動脈造影法、コンピューターX線体軸断層撮影(CAT)スキャン、放射性核種ラベル化血小板を用いたインビボ映像法、二次元ドップラー装置を用いたロケーション(location)法等が含まれる。血小板依存性動脈血栓症が役割を演じる特殊な疾患も本技術分野では周知であり、脳卒中若しくは一過性大脳虚血により明らかになる脳血管アテロース性動脈硬化症；心臓虚血、非安定性アングナ若しくは急性心筋梗塞により明らかになる心臓アテロース性動脈硬化症；及び末梢虚血により明らかになる末梢動脈閉塞症等が含まれる。

血小板依存性動脈血栓症の治療を必要とする患者には、狭窄動脈内の血流を改善するために医療(治療)処置を受ける者も含まれる。たとえば、動脈瘤、アテローム性動脈硬化症プラグ状動脈血栓等の閉塞性存在を除去するために行なわれた治療処置の間に被覆されなかったか若しくは作られた動脈内損傷によって誘発された血小板依存性血栓症による治療後再狭窄症を多くの患者が経験する。

このように、本発明は患者における治療後動脈再狭窄症を予防する方法で、以下の(a)、(b)及び(c)を含む方法に関する：

(a) 該患者に対する治療上有効な量の式(1)のペプチド、好ましくはPPACKの投与。

(b) 該患者に対する狭窄動脈内の血流管直径を増大させ、それにより処置動脈を作成するための医療処置の実施。狭窄動脈の血流管直径を増大させるための医療処置は本技術分野において周知であり、外科的処置(手技若しくは器具あるいは装置の介在によってなされる、手による若しくは操作運転による治療方法)及び薬物療法を含む。たとえば、狭窄動脈の血流能力を改善するために行なわれる外科的処置には、動脈内膜切除術、特に、ガス若しくはレーザー動脈内膜切除術、血管形成術、動脈血管補綴挿入等が含まれる。

狭窄動脈の血流能力を増大させるための医療処置には、患者への治療上有効な量の血栓溶解剤の投与も含まれる。血栓溶解剤及びそれらの使用は同様に本技術分野において周知である。市販の血栓溶解剤にはストレプトキナーゼ、ウロキナーゼ及び組織プラスミノゲン活性化剤(tPA)が含まれる。

(c) 該患者の動脈血を該処置動脈中に循環させる。

治療後再狭窄症の処置に対する好ましい方法において、(a)による式(1)のペプチドの投与は(b)により該処置動脈を循環動脈血にさらすより前に行なわれる。好ましくは、(a)は(a)に引き続いて行なわれるが、(a)により投与した式(1)のペプチドの血漿中濃度が最低約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは最低約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは最低約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間に於ける。他の態様においては、(a)は(a)が行なわれた後約90分以内、好ましくは約15分以内、より好ましくは約5分以内に行なわれる。

該置等が含まれる。エクスピボの治療装置の使用は本技術分野においては周知である。

補綴表面上への血小板沈着を予防する好ましい方法において、(a)による式(1)のペプチドの投与は、(b)により該患者の動脈血を補綴表面上に循環させるより前に行なわれる。好ましくは、(a)は(a)に引き続いて行なわれるが、(a)により投与したペプチドの血漿中濃度が最低約0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは最低約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは最低約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の間に於ける。他の態様においては、(a)は(a)が行なわれた後約90分以内、好ましくは約15分以内、より好ましくは約5分以内に行なわれる。しかしながら、本発明は(a)及び(b)が実質上同時に行なわれ、かつ(c)が(a)より先に行なわれる方法にも関する。

式(1)のペプチド若しくはそのハロゲン酸付加生成物は通常樽液若しくは懸濁液の形態の医薬用組成物として投与されるが、もっとも、周知のようにペプチド類は錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放剤若しくは粉末剤としても治療投与に処方することができる。いずれの場合も、該投与組成物は約0.10%から約99%、好ましくは10%-90%、より好ましくは25%-75%の式(1)のペプチドを含有する。

活性成分としてペプチド類を含有する治療用組成物の製造は本技術において周知である。通常、このような組成物は液体溶液若しくは液体懸濁液のいずれかの注射可能薬物として製造されるが、もっとも注射前に液体、若しくは懸濁液にするのに適当な固形形態も製造することができる。該製造物も乳化することができる。該活性治療用成分は、医薬上許容しうるかつ該活性成分(ペプチド)と適合する無機及び/又は有機賦形剤としばしば混合される。適当な賦形剤としては、たとえば、水、生理食塩水、

しかしながら、本発明は(a)及び(b)が実質上同時に(同一時間)に行なわれ、かつ(c)が(a)より先に行なわれる方法にも関する。

動脈血栓症に対する治療を必要とする患者にはさらに、その循環動脈血が血栓形成表面を流ることになる患者が含まれる。血栓形成表面が動脈循環にさらされる状態は動脈補綴装置を外科的に挿入してある患者において通常発生する。このように、本発明は動脈補綴装置の血小板沈着を予防する方法で、以下の(a)及び(b)を含む方法に関する：

(a) 該患者に対する治療上有効な量の式(1)のペプチド、好ましくはPPACKの投与。

(b) 該患者の動脈血を補綴表面上に循環させること。

患者の循環中に外科的に挿入されその表面が動脈血にさらされる動脈内補綴装置は本技術分野において周知である。*生物由来及び合成血管補綴、*J. スタンレイ編、グルーネ及びストラットン、ニューヨーク、1982年、を参照のこと。生物動脈補綴の例としては、自家動脈移植片、特に自家伏在静脈動脈移植片、リアルデヒドでふん-褐色化(tanned)ウシ異種移植片、ヒト膜静脈移植片等が含まれる。合成動脈補綴も本技術分野では周知であり、ダクトン移植片、米国特許第3,962,153号に記述されたもののような拡張ポリ四フッ化エチレン移植片、米国特許第4,687,482号に記述されたもののような疎水性重合体連続移植片等が含まれる。

動脈補綴装置の例としては動脈ステント(aten) 、A-V吻合等がある。A-V吻合は通常非内皮処理化管断片で、一般に重合物質で構成されており、動脈血を直接静脈に輸送するか若しくは、最初に静脈を通してエクスピボ(生体外)の治療装置に輸送するために使用される。エクスピボの治療装置の例としては心肺補助

デキストロース、グリセロール、エタノール等、及びそれらの混合物がある。さらに、必要ならば、該組成物は該活性成分の有効性を高める少量の界面活性剤あるいは乳化剤、pH緩衝剤等の補助剤を含有することができる。

本発明の実施において有用な治療用組成物は、中性の医薬上許容しうる塩の形態で該治療用組成物中に処方された式(1)のペプチドを含有することができる。医薬上許容しうる塩類には該酸付加塩類(該ポリペプチド若しくは抗体分子の遊離アミノ基と形成される)及び、たとえば塩酸あるいはリン酸等の無機酸、若しくは酢酸、檸檬酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸と形成されるものがある。該遊離カルボキシル基と形成される塩類はまた、たとえば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、若しくは水酸化鉄(III)等の無機塩基類、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基類より誘導することもできる。

該治療用ペプチド含有性組成物は通常静脈内に、たとえば単位投与量を注射することにより、投与される。本発明で用いられる治療用組成物に関して使用される*単位投与量*という用語は、ヒトに対する単位投与として適当な物理的に不連続の単位を言い、各単位は必要な賦形剤とともに定められる治療効果をもたらすように計算されたあらかじめ決められた量の活性物質を含有する。

該組成物は該投与処方に適合した形式で、かつ治療上有効な量を投与される。投与されるべき量は治療をうける患者、すなわち該患者の止血系の該活性成分を利用する能力、及び求められる血小板凝集阻害の程度に依存する。活性成分の投与を必要とされる正確な量は該医師の判断に依存し、各個人に特有である。もっとも

も、適当な投与量範囲は1ないし数百ナノモル/キログラム体重/分のオーダーの式(II)のペプチドであり、投与経路に依存する。

他の態様においては、本発明は両端の開いた実質的に非弾力性の中空本体部分を持つ延長管断片を含む血性抵抗性血管補綴に関する。該中空本体部分は制限された流管であることの定義となる管腔(循環血液接触性)表面を持つ。式(II)のペプチドは該管腔表面に除去可能に付着している。

「除去可能な付着」は、式(II)のペプチドが制限された該血流管を通して循環する血液と接触する間に該血流管中に溶解できるように該補綴の管腔表面に付着していることを意味する。除去可能な付着は、固体若しくは液体の形態の式(II)のペプチドの該管腔表面上への吸着による沈着を含む周知の方法により完成される。実質的に純粋な形態(最低約99%の純度)のペプチドを該表面に結合させた場合、それは該補綴と接触する間に非常に迅速に溶解して、該管腔表面上に該ペプチドの血漿中溶解度にほぼ等しい局所ペプチド濃度を提供するであろう。

好ましい態様においては、該補綴装置の該管腔表面に除去可能に付着した式(II)のペプチドは徐放性処方の一部として存在する。通常の徐放性処方は医薬上許容しうる生物分解可能な賦形剤と混合された式(II)のペプチドを含む。徐放性処方中の使用に適した医薬上許容しうる生物分解可能な賦形剤類は周知であり、重合体類(たとえば、ポリエチレングリコール)、ポリアミノ酸類(たとえば、ポリグリコール酸)等を含む。式(II)のペプチドを含む徐放性処方が該管腔表面に除去可能に付着された場合、該血液中のペプチドの局所濃度(すなわち、該血液-管腔表面界面における該ペプチド濃度)は該賦形剤の溶解速度に比例すると思われる。ペプチド対賦形剤の割合は、本技術分野において周知のように、賦

形剤の選択及び該補綴血流管内の血流条件に依存するため、治療上有効な量の式(II)のペプチドは徐放性処方が用いられる場合、数時間から数日の間、該管腔表面に接触する血液に供給される。

本発明の血管補綴は、その好ましい態様においては、実質的に非弾力性である。ここで使用する場合、「非弾力性」という表現は、正常な動脈圧(250 mmHg以下)下の収縮期及び拡張期の間に内径の伸張が10パーセント以下を示すことを意味する。該血管補綴の外部表面は、現在市販されている補綴について一般的である様に、ヒト若しくは他の哺乳動物における移植時に組織固定してもよい。

該血管補綴の該管腔分節は必要な強度、耐久性及び適合性を示す物質で構成されてもよい。我々が該補綴若しくは移植片を製作するのに適当な市販の物質には、ダクロン(C. R. バード社、ビレリカ、マサチューセッツ州)等のポリエスチル及びテフロン(ゴアテックス)(W. L. ゴア、フラグスタッフ、アリゾナ州)等のポリフッ化炭素が含まれる。

好ましい態様においては、該管腔表面は比較的なめらかで、非弾性の疎水性表面を形成する重合体類を含む。このような物質類及び管腔表面の一部を形成する限のおおのの使用はハンソンの米国特許第4,687,482号に記述されており、その開示は参考文献としてここに組み込まれている。

本発明の血性抵抗性血管補綴は、式(II)のペプチドを該補綴の該管腔表面上に除去可能に付着させることを含む方法により製造される。このように、血管補綴装置の管腔表面への式(II)のペプチドの除去可能な付着は、該装置の血性抵抗性を改善する方法である。
実施例

以下の実施例は本発明を具体的に表わすことを意図しているが、

制限することを意図しない。

1. 合成動脈補綴装置上の血小板沈着のインビボ阻害

制限されない変数のない形式でのインビボの急性動脈血栓形成の速度を定性するために、血管移植片血栓症の一次モデルを使用した。ヒヒはヒトと同様の血栓症経過を持つらしいので、これらの実験に対してヒヒを選択した。急性血栓形成の程度は、ハンソンら、アルテリオ、5巻、第595-603頁、1985年、に記述されているように、自己由来の¹¹¹インジウムラベル化血小板の小内径ダクロン血管移植片の断片上への吸着をシンチレーションカメラで映像化することにより、実時間に関連した。

要約すれば、長期動脈シャントは正常な10-12キログラムのオスヒヒ(バビオアスビス)の大腸動脈間に外科的に移植された(A-Vシャント)。該永久シャント系は13-及び15-ゲージのテフロン管先端(ライフメド、ベントロン社、コンプトン、カリフォルニア州)に接続した内径(1.4)3ミリメートル(mm)、長さ25センチメートル(cm)のシリステック管(ダウコーニング社、ミッドランド、ミシガン州)2本から成る。さらに、2本の該シリステック管を皮膚出口部位でダクロン縫合カフス(デュボン、E. I. ドスモア社、ウィルミントン、デラウェア州)で固定した。2個の該シリステック吻合断片を長さ1cmの鈍角末端のテフロン管(内径2.8mm)で連結することにより、血流を確立した。全実験において、その後ダクロン血管移植片を該永久シリステックA-V吻合断片間に挿入することにより、該動物の外科的に連結した。

モデルの合成血管補綴は以下の方法で、長さ10cmの非クリンビングニットダクロン移植片材料(サビジエクスターナルペロア、120 mmHgにおける平均有孔性: 2000ないし2200

mmHg /分、内径4.0mm)を血液漏出不透過性にするように、該A-V吻合系での使用にむけて製造された。

最初に、4.0mm径のテフロンロッド(あらかじめ、穏やかな石けん液、それに次いでエタノールを使用し、最後に滅菌蒸留水ですすぐことにより完全に洗浄してあるもの)を該移植片中に挿入した。その後、該移植片を外側から5×10cmのパラフィルムシートで包み、長さ10cm、内径6.3mmの「熱収縮性」テフロン管(スモールパーツ社、マイアミ、フロリダ州)内に入れた。

該移植片断片を含むテフロン管を低ブレンセン炎上で約5.3mmまで収縮が起きるまで穏やかに加熱し、その結果初めの該移植片表面を変化させずに該外部組織間隙上に該パラフィルムを圧縮させた。シリコンゴム管、長さ10cm×内径4.0mm、を該テフロンロッド上に移動し、シリステック医療用接着剤、シリコンタイプAを用いて該移植片断片の両端に接続した。該重合体を24時間硬化させた後、該テフロンロッドを該管腔内から注意深く引き出した。本処置により、直線形状に厳密に圧迫され4.0mmの内径を持つ不透性移植片が製造された。でき上がった等直径の血流管は、連結処置による欠陥もなしに該シリステックから移植片表面への境目がなめらかであった。該移植片は鈍端テフロン探検子を用いて該ヒヒの吻合系内に接続された。

自己由来のヒヒ血小板を以下の処置により¹¹¹Ia-オキシンでラベルした。全血(100±2)を20±2の酸-クエン酸-デキストロース抗凝血液(N1H処方A)を含むプラスチックバック中に直接採取した。該血液を該バック中で300xgで10分間遠心した。上清の濃縮血小板血漿(PRP)を第2のバッグにその後移し、0.15Mのクエン酸(0.1±2/10±2PRP)を加えてpH6.5に調整した。赤血球分画は供血動物に返却した。該

PRPを1300 μ gで15分間遠心して血小板をペレット状にした。上清の血小板不足血漿(PPP)は完全に別の容器に移し、廃棄した。

残りの血漿蛋白類を除去するために、該血小板ペレットを含むバッグを30 μ lのリンガーのクエン酸デキストロース(RCD、pH6.5)を上層した後に他に移し廃棄することにより、注意深く一回洗浄した。該ペレットをその後ゆっくりと5.0 μ l RCDに再懸濁し、500-700マイクロCi ^{111}In -オキシシン(アマシャム社、アーリントン、ハイツ、イリノイ州)とともに30分間インキュベートした。灌入している赤血球は最後に200 μ gで5分間低速遠心して除去した。

200マイクロリッターのラベル化血小板懸濁液を5.0 μ lのRCDで希釈し、0.5 μ lの該母体血小板懸濁液の放射能を、3000 μ g、30分間の遠心後得られる無細胞上清0.5 μ lの活性と比較することによりラベル効率を測定した。約13パーセントの非血小板結合性アイソトープを含むラベル化血小板懸濁液の測定した量を、100マイクロリッター標準液を調製した後に直接受血哺乳動物に注射した。非血小板結合性アイソトープを除去するためにさらに洗浄する処置は、インビトロの細胞損傷をもたらすと思われるため望まないと考えた。

循環血小板 ^{111}In -放射能は移植片配置前及び後に採取し、2 μ l/1 μ lの(エチレンジトリロ)-四酢酸(EDTA)中に加えた4 μ lの血液サンプルから測定した。各サンプルのうち1 μ lの血小板数測定に使用し、1.0 μ lは全血 ^{111}In -放射能を測定した。残りの2 μ lを3000 μ g、30分間遠心し、上清(PPP)のうち1 μ lについて血漿 ^{111}In -放射能を測定した。血液及び血漿の全サンプルはガンマスペクトロメーター(スクレ

アシカゴ、シカゴ、イリノイ州)を用いて測定した。血小板数測定は電子血小板カウンター(クレイアダムスUP-100、パーシパニー、ニュージャージー州)を用いて全血について行なった。

^{111}In のガンマ光子ピーク(172keV及び247keV)のシンチレーションカメラ映像化には、一般に高エネルギーコリメーションが、感度及び空間的分解能の両方を低下させるにもかかわらず、映像の不鮮明化を防ぐために必要とされてきた。血小板放射能活性が本実験では制限因子ではなかったため、高感度 ^{111}In コリメーターを ^{111}In の低い方のエネルギーピークのみを映像化することにより(172keVピーク及び5%エネルギーウィンドウにおいて)良好な分解能で使うことができた。近位及び遠位シラスティック断片を含む該グロン移植片の映像はビッカーDC4/11ダイナシンチレーションカメラ(ビッカー社、ノースフォード、コネティカット州)で取り、該カメラに連結した医用データシステムS1MULコンビューター(メドトロニック、アンアーバー、ミシガン州)により保存及び分析した。本システムは84 \times 64路モードでデータの同時取得及び分析ができ、図3に示したデータを作るために使用した。該移植片をエクスピド映像化する直前に、2分間の映像を、血小板懸濁液の200マイクロリッターサンプル(注射液標準)及び自己由来血液で満たされた該移植片と同管腔容量を持つ内径4mmのシラスティック管(血液標準)について取った。

全ての標準液及び管は直線形状を維持するように、該コリメーターの表面から約1cmの所にあるプレキシガラス中に正確に規格化された溝の中に置いた。該標準液及び10cmの移植片の放射能を重要な同じく3.1cm \times 12.5cm領域(10cm \times 40画素)についてカウントし、画像分析ソフトウェアルーチンにより定義した。

移植片設置時間から、映像をデータを保存しながら2分間隔で連続的に取った。沈着した ^{111}In -血小板の放射能は該血液標準放射能を自動的実験映像から推定することにより計算した。

^{111}In -血小板の調製品を1回注射の後数日間移植片を逐次設置し、映像化した。循環する ^{111}In -血小板放射能は、正常な生理的循環を通じて連続的に、また一連の移植片設置により急性に失われたため、血小板蓄積の測定値は、沈着した移植片放射能を各評価の開始時に測定した該移植片内の全血(循環)血小板放射能で割った比率を定義した。移植片/血液比として表現した。本測定値は該哺乳動物のサイズ、注射したアイソトープの量、若しくは該アイソトープが検査したと考えられる範囲に依存しないため選択された(リッチーら、アメリカンジャーナルオブカルディオロジー、47巻、第882頁、1981年；カローラ、アンニアルサージェリィ、191巻、第362頁、1980年)。該移植片/血液比は、しかしながら、該循環中の加齢若しくはトロンボゲン表面の反復通過の結果として起こる血小板機能の酸性における観察のタイミング若しくは順序に依存する。

該移植片/血液比を測定するために、該移植片管腔(1.26 μ l)内血液の放射能を2つの別々の方法で測定した。最初に、該血液標準(1.57 μ l血液量)を映像化した後、それを直接計算した。第2の方法では、各実験開始時に存在した血液1 μ lあたりの放射能を、該注射液標準を各実験前に映像化し、この値に該実験時点に採取した全血1 μ lあたりのCPM(ある経過時点1.において、ガンマカウンターを用いて測定)を掛け、注射液標準の放射能(同様に、1.においてガンマカウンターで測定)で割ることにより計算した。全ての血液サンプル及び標準を各評価シリーズの終わりに同時にカウントした。全ての計算において、

放射能値は血小板放射能のみに関するものであり、全ての血液及び標準についての値は非血小板性アイソトープ分画について補正した。

該血小板沈着(ラベル化プラス非ラベル化細胞)は移植片/血液比に因子：移植片血液容積(1.26 μ l) \times 全血1 μ lあたりの血小板濃度、を掛けて評価した。本計算には、該ラベル化及び非ラベル化血小板母集団が移植片沈着に関しては全時点において同等であったという仮定が含まれた。上記の方法により測定した該血管移植片上への該血小板沈着に対する値は第3図に示す。

無処置の対照動物において、該血管移植片上への血小板沈着は、60分で 8.5×10^4 血小板のプラトー値に達し(第3図)、該移植片は 1.2 ± 0.2 時間で閉塞した。さらに、表1に示すように、これらの対照実験における血栓形成期間中に、血小板特異性アルファ顆粒蛋白である血小板因子4(PF4)及びベータトロンボグロブリン(β TG)、及びトロンビンによるフィブリノーゲン分解産物であるフィブリノペプチドA(FPA)の血漿レベルの上昇が観察された。

表 1

血管移植片血柱形成に対するPPACKの効果

	基準値		PPACK 処置	
	移植前	移植後	移植前	移植後
血小板数 ($\times 10^9/L$) ¹	344 \pm 68	290 \pm 75	275 \pm 56	269 \pm 54
¹¹¹ In-血小板沈着 ($\times 10^3$)	---	8.5 \pm 1.0	---	---
0.4 \pm 0.2				
血漿PF4 ($\mu g/L$) ²	9.2 \pm 2.4	18.5 \pm 1.7	7.1 \pm 1.9	4.4 \pm 0.2
血漿BTG ($\mu g/L$) ²	6.0 \pm 2.6	28.2 \pm 1.2	8.0 \pm 2.0	1.4 \pm 0.2
血漿FPA (nmol/L) ²	20.8 \pm 2.7	27.2 \pm 8.6	19.0 \pm 4.7	2.0 \pm 0.54

¹ 全血中で電子的 (J. T. ベイカー、B10型分析器、アレントン、ペンシルバニア州) にカウントした血小板数は、血管移植片血柱形成期間中の血小板形成により該循環中において減少した。

² 血漿PF4及びB-TGはハンソンら、アーテリオスクレロシス、5巻、第595-603頁、1985年、に記載されているように採取及び処置した血液サンプルに対するラジオイムノアッセイにより測定した。血漿中のこれらの血小板特異性蛋白の増加は、血柱形成に利用された血小板からの放出を反映した。

³ 前記のハンソンらの方法によるラジオイムノアッセイにより測定したFPA値も同様に増加しており、移植片血柱における血

表 2

止血作用に対するPPACKの効果

血小板 ¹	基準値	PPACK投与期間中	
		(100nmol/kg/分)	(15分)
血小板数 ($\times 10^9/L$)	290 \pm 75	275 \pm 56	269 \pm 54
出血時間 (分)	5.4 \pm 0.3	>30	5.9 \pm 2.6
凝集 (ED ₅₀) :			
ADP (μM)	7.1 \pm 0.8	2.3 \pm 0.3	--
アセチル ($\mu g/mL$)	4.2 \pm 0.4	2.6 \pm 0.3	--
トロンビン (U/mL)	0.1	>20	
凝血			
フィブリノーゲン (g/L)	3.67 \pm 0.33	3.80 \pm 0.33	3.75 \pm 0.35
トロンビン 時間 (秒)	21 \pm 3	>600	19 \pm 1
フィブリン 溶解			
フィブリノーゲン (mg/L)	163 \pm 13	163 \pm 8	174 \pm 7
D-リザー (mg/L)	0.45 \pm 0.10	0.49 \pm 0.08	0.53 \pm 0.13

¹ 血小板止血作用を、血小板数、血小板プラグ形成能 (テンプレート出血時間)、及び血小板凝集に関して評価した。血小板凝集はクエン酸添加の塊血小板血漿の攪拌懸濁液を遠心分離後、記録することにより測定した。該結果は1/2 最大凝集をもたらすのに必要な作用物質 (ADP、コラーゲン及びトロンビン) の濃度で表わしてある。結果は平均値 \pm 1標準偏差で表わしてある。加えて、PPACK投与期間中に血小板若しくはFPAから血漿中へのPF4若しくはBTGの放出は検出されなかった (表1)。

表3に示したインビボの用量-作用実験の結果は、トロンビン誘導性血液凝固及び出血時間の遅延化と、約15分間の100

血柱形成期間中のトロンビンによるフィブリノーゲン凝集産物を要している。

ヘパリンの通常用量 (該移植片を動脈血にさらす前に湧として100単位/kg投与) は移植片血小板沈着に効果を持たなかった (第3図B: $p > 0.5$) が、ヘパリン用量を10倍増加すると部分的に有効であった (第3図B)。アスピリン (移植片設置の2時間前に経口で32.5mg/kg/日投与) 及びアスピリンとヘパリン (100単位/kg) の併用のいずれも、同様に行なわれた以前の実験における血管移植片¹¹¹In-血小板沈着に影響を及ぼさなかった。ハーカーら、"血管疾患: 最新の研究と臨床応用"、ストランドネスら編、オランダ、グルーネン・ストラットン、第271-283頁、1987年、参照のこと。このように対照動物においては、該血管移植片は血柱形成性が高く、フィブリン形成の阻害 (ヘパリン処置)、血小板凝集の阻害 (アスピリン処置) 若しくはそれらの両方 (アスピリン及びヘパリン処置) を目的とした通常の抗血栓症治療に抵抗性を持った。

対照的に、PPACKの血漿中濃度を約1-2 $\mu g/mL$ にする100nmol/kg/分の速度での静脈内注入は¹¹¹In-血小板沈着を完全に抑え、移植片閉塞を予防した (第3図A)。表2に示すように、PPACKはまた止血性血小板プラグ形成も抑え (出血時間を30分以上に延長し、対照値と比較して $P < 10^{-3}$)、トロンビン誘導性血液凝固も抑えた (トロンビン時間>10分、対照値と比較して $P < 10^{-3}$)。

nmol/kg/分の速度での注入でもたらされた約1-2 $\mu g/mL$ のPPACK血漿濃度において観察された最大効果における予想外の一致を明らかにしている。

表 3

PPACKの用量-作用効果

PPACK用量 ¹	出血時間	トロンビン時間
(nmol/kg/分)	(分)	(秒)
0	5.4 \pm 0.3	17 \pm 3
15	7.6 \pm 1.6	19 \pm 3
30	9.5 \pm 4.2	22 \pm 2
60	26.6 \pm 3.4	279 \pm 132
100	>30	>600

¹ 5匹の別々の動物において、表示した用量漸増形成に従ってPPACKを静脈内注入した。15分間の所定用量の連続注入の後、該テンプレート出血時間測定を開始し、トロンビン時間測定に血液を採取した。次の用量への漸増は出血時間測定が完了した後即ちに行なった。該結果は平均値 \pm 1標準偏差で表わしてある。

PPACKをヒビ血漿にインビトロで加えた場合、トロンビン時間は6 $\mu M/L$ 以上の濃度においては著しく長くなったが、これは該注入データ (表3) と一致する。治療期間中、心拍数及び血圧に対して何ら効果ももたらさなかった。PPACK注入停止後、¹¹¹In-血小板の移植片沈着は第3図Aに示すように30分間で常態化し、出血時間及びトロンビン時間は表2に示すように15分以内に十分正常化した。

トロンビン誘導性血小板凝集はPPACKが3.2 \pm 0.1 $\mu g/mL$ (nmol/L) 以上の濃度で存在した間押さえられた (表2) が、一方

コラーゲン若しくはADPにより誘導される血小板凝集はPPACKによって阻害されなかった(表2)。このように、血小板の固有の反応性は影響を受けなかった。

2. 血小板沈着及び動脈再狭窄のインビボにおける阻害

A. PPACKの動脈再狭窄阻害能をインビボの動脈移植片挿入及び動脈内膜切除のヒヒモデルにおいて試験した。移植片挿入として、長さ3cmのゴアテックス移植片(内径4mm)の形態の小血管補綴を、オスのヒヒの頸動脈中に外科的に挿入した。該移植片を通して(該補綴表面を通して)動脈血液を循環させる直前、及びその後1時間の期間中、約100neol/kg/分の速度で該ヒヒにPPACKを静脈内投与した。対照動物はPPACK処置を受けなかった。¹¹¹In-血小板沈着は実施例1に記述したように動脈血栓を再構成したものについてモニターした。

動脈内膜切除術として、ヒヒの頸動脈に標準的外科処置により動脈内膜切除を行なった。該内膜切除(処置)動脈を通しての血液循環の直前、及びその後1時間の期間中該ヒヒに約100neol/kg/分の速度でPPACKを静脈内投与した。対照動物はPPACK投与を受けなかった。

両実験の結果は同等であった。該動脈内膜切除実験のデータは第4図に示されており、血小板沈着(再狭窄)がPPACK投与を受けた動物においては対照動物と比較すると90-95%阻害されたことを示している。

B. 動脈内膜切除の別の実験においては、体重が8ないし11kgの14匹のヒヒ(オス10匹及びメス4匹)に、ここに記述した標準的外科処置により動脈内膜切除を行なった。

動物達に前麻酔としてアトロピン(0.04mg/kg筋注)を投与し、その後導入用にケラミン(10mg/kg筋注)及び維持用に

気管内チューブによるハロタン(酸素中1%)を用いて麻酔した。頸部中線切開を通じて、総頸動脈を近位は鎖骨から遠位は頸動脈分岐点までの周辺組織から離すように切開した。該総頸動脈を、該ヘパリン(100単位/キログラム、(U)/kg)、静注)の塊状注射の3分後に該露出血管の各末端に設置した非外傷性血管クランプを用いて横に締め、該遠位横断クランプの1cm近位を分割した(第6図)。該近位動脈断片をその後ピンセット上に裏返した。該ピンセットを該血管の切断末端から挿入し、その後血管内側から該動脈壁の全厚みの引っ掛かりを得て、近位方向の該血管分枝末端を逆に引っ掛けて裏返した。最大露出が得られた後、該管腔断片上に一對のポリプロピレン固定縫合(7-0)を近位の両側に、また第2の対を遠位に取り付けた。その後動脈内膜切除術を、裏返した該血管断片の分割末端から1cmの所から始めて施し、1cmの区間連続して行なった。本処置にはピンセット及び手術用顕微鏡(倍率×32、ザイスイ手術用顕微鏡、西ドイツ)を用いて該正常内膜、及び中膜の厚みの一部を機械的に除去することが含まれた。動脈内膜切除術の後、該血管をその正常な配置に戻し、2%の倍率下で7-0ポリプロピレン糸で末端-末端吻合を施した。該処置動物において、静脈内PPACK注入は該手術頸動脈中の血液回復の5分前に開始した。5-MHzペンシル型ドップラー探針(パクス電子研究所、ビーバードン、オレゴン州)を用いて該動脈内膜切除部位の近位と遠位、及び該吻合部位について閉存を評価した。¹¹¹In-源を内部標準として移植した(以下参照)。傷を断続的縫合で閉じ、シンチレーションカメラによる映像化を即ちに行なった。該動物達は該処置に十分耐えた。血液損失量の評価は約25mlであった。

自己由来のヒヒ血小板を、先に実施例1で述べたように800

-10000µCi(1Ci=37GBq)の¹¹¹In-オキシドでラベルし、該手術処置の前に注射した。

中型エネルギーコリメーターを¹¹¹Inジウムの高及び高エネルギーピークの両方を映像化することにより良好な分解能で使用した。該頸動脈の映像をビッカーDC4/11ダイナシンテレシジョンカメラ(ビッカー社、ノースフォード、コネチカット州)で取り、該カメラに接続した医用データシステムA[®] コンピューター(メドトロニック、アンアーバー、ミシガン州)により分類及び分析した。全血5mlサンプルについても同様に映像を取った(血液標準)。

校正のために、小¹¹¹In-ラジオアイソトープ源(約5µCi)を0.6mm内径のポリエチレン管(PE-50、クレイダグス社、ニューヨーク、ニューヨーク州)の末端に密封し、手術時に該動脈内膜切除部位と同じ組織面内の該総頸動脈に隣接して設置した。初期5分の映像を取った後(以下参照)、該¹¹¹In-源を回収し再カウントした。傷の中に移植された時点と除去後の該内部標準の¹¹¹In放射能の比率は、該動脈内膜切除部位に沈着した¹¹¹In放射能に対する分在組織の滅失作用を直接測定するものとなる(ハンソンら、アルテリオスクレロシス、6巻、第511-518頁、1986年)。5ml全血標準、傷からの除去前後の内部校正標準、動脈内膜切除部位及び対照側頸動脈の放射能を、画像分析ソフトウェアアルチンにより定量化しながら、重要な領域についてカウントした。沈着した¹¹¹In-血小板の放射能は、該対照側頸動脈領域の放射能を実験映像から減じ、組織滅失について補正し、該全血標準を用いて該結果を沈着した血小板で表わすことにより計算される。

実施例1の場合と同様に、循環する¹¹¹In-血小板放射能は正

常な生理的循環を通じて連続的に失われ、また該急性映像の後の血小板蓄積の測定値は総数の形で表わすことができない。データはより遅い時点で取り、動脈内膜切除領域放射能から対照性非処置対照動脈管腔内の循環血小板放射能を減じ、該血液標準放射能で割った比率を定量化した該動脈内膜切除/血液比として表現する。本測定値は該動物のサイズ、注射したアイソトープの量若しくは該アイソトープが滅失したと考えられる範囲に依存しない。全ての計算において、放射能値は血小板放射能のみに関するもので、全血及び標準値は非血小板性¹¹¹In-放射能小分画について補正した(ハンソンら、ジャーナルオブクリニカルインベスティゲーション、81巻、第149-158頁、1985年)。

各動物に同側頸動脈内膜切除術に続き、血流を回復させた60及び90分後、及び24、48、72時間後に5分間シンチレーションカメラ映像を取った。術後第1日目に24時間時の映像を取る前に、各ヒヒを塩酸ケタミン(10mg/kg)で麻酔し、該傷を開き、該ペンシル探針ドップラーを用いて動脈閉存性を評価した。該傷を閉じ、映像化を行なった。

血小板カウント及びヘマトクリット測定をベーカー810型全血分析器を用いて、Na₂EDTA(2mg/ml)中に採取した全血について手術前及び2日間毎日行なった。平均血小板カウントは対照群が $318 \pm 70 \times 10^3 / \mu\text{L}$ で、処置群は $296 \pm 53 \times 10^3 / \mu\text{L}$ であった。

出血時間測定は、先にヒヒでの実験について述べられた標準テンプレート法(ハーカーら、ブラッド、58巻、第824-834頁、1980年)を用いて、前腕の毛をそった手の平の表面において二回ずつ行なった。

PPACKの抗トロンビン活性レベルを点検前、点検開始後

30分及び60分、及び治療終了後30分に、酸-クエン酸デキストロース (ACD) に採取した血液から調製した血漿について測定した。血漿抗トロンビン活性レベルは、該動物自身の対照処置前血漿中に調製したPPACKについての標準曲線を用いて、即ちにアッセイするか、若しくは後でアッセイするように-70℃で瞬間凍結した。

該PPACK溶液は0.15M NaClに溶解し、濾過滅菌した。該PPACK溶液をシリジソンプ (ハーバート機器社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州) を用いて100 neoL/kg/分の速度で約1時間連続的に注入した。

血小板は、対照動物においては即座に動脈内膜切除部位に着し、血流再開後60分以内にプラトーに達した (第7図)。その後動脈内膜切除対血液比 (EBR) は、該対照動物においては上昇し続け、最初の3日間に 3.03 ± 0.51 から 3.25 ± 0.48 に極わずかに増加した ($p=0.759$; 第7図)。対照的に、手術後90分の該動脈内膜切除部位への急性血小板沈着はPPACK処置を受けた動物では該対照動物と比較して著しく減少した (それぞれ、 $1.59 \pm 0.36 \times 10^8$ 対 $1.167 \pm 1.61 \times 10^8$ 血小板数/cm; $p<0.002$)。また、その後3日間の血小板沈着も該動脈内膜切除領域の正味の放射能対該対照の血液放射能のそれぞれの比率 (EBR) で評価すると減少し続けた。手術当日の90分後において、該比率はそれぞれPPACK処置動物については 0.82 ± 0.25 、また対照動物については 3.03 ± 0.51 であった。3日後のEBR比率は該対照動物では 3.25 ± 0.48 であったのに対して、PPACK動物では 0.85 ± 0.23 であった。ドップラースキャンニングによると管理中24時間について両群とも該血管は全て開通していた。

PPACK点清は最低3日間血小板沈着を有意に阻害することを示している。

本技術分野で示唆されるようなPPACKの連続的投与は、それゆえ手術後遅くまで有意の治療的効果をもたらすために必要ではない。

本発明はこのように、哺乳動物における血管形成術、動脈内膜切除術、血管内ステント設置及び小径血管移植片移植等の血管処置の介在に伴う血小板依存的動脈血栓症を予防する手段を提供するものである。

3. 動脈補綴表面への血小板沈着の阻害

A. 長期動脈大腸吻合内に設置したエクスピボの治療装置の例として中空線維 (キャピラリー) 血液透析器を用いてのPPACKの作用を、補綴表面における抗血栓作用を証明するために選んだ。

0.8ポキュプロファンキャピラリー血液透析器 (12.11型; トラベノール、ディアフィールド、イリノイ州) を実施例1で述べたように7匹の別々のオスのヒヒのA-V吻合系内に挿入した。PPACKを該ヒヒに100 neoL/kg/分の速度で、該ヒヒの動脈血が該透析器の補綴表面を (該透析器のキャピラリーを通して) 循環する以前及び循環中にわたり約1時間静脈内投与した。比較する目的で、対照実験としてPPACKの代わりにヘパリンを投与した。ヘパリン投与は150単位 (U)/kg体重の初回投与及びそれに続く該ヒヒの動脈血が該透析器を運って循環する以前及び循環中の1時間にわたる150 U/kg/時間の連続的点滴から成った。該補綴 (キャピラリー) 表面における血小板沈着の阻害は、該透析器を運って動脈血を循環させた前後の該透析器により保持される生理食塩水の容量を測定することにより判定

した。手術後90分に得られたシンチレーションカメラ映像は、対照動物の該動脈内膜切除部位における血小板の焦点蓄積を明らかにした。PPACK処置は該動脈内膜切除部位における ^{111}In -血小板放射能の著しい減少を結果としてもたらした。動脈内膜切除術の3日後の、非処置動脈内膜切除血管表面のスキニング電子顕微鏡検査は、急性の血小板血栓形成を明らかにした。PPACK処置を受けた動物の動脈内膜切除部位における目に見える血小板沈着は著しく減少した。

PPACKの血漿レベルは点滴期間中一定に維持され、点滴停止後即ちに低下した (表4)。PPACKは点滴開始後出血時間を処置前の 5.6 ± 0.8 分から、点滴期間中は全動物において30分以上に延長した。該出血時間はPPACK点滴停止後30分では正常であった (6.2 ± 1.3 分)。

血小板数は該処置動物において実験期間を通じて変化しなかった (第3日において、 $296 \pm 53 \times 10^3 / \mu\text{L}$, $p=0.725$)。

表 4
PPACKの血漿レベル

基準値	
点滴後30分	$3.72 \pm 0.61 \mu\text{g} / \text{mL}$
点滴後60分	$3.71 \pm 0.47 \mu\text{g} / \text{mL}$
点滴後90分	$1.12 \pm 0.27 \mu\text{g} / \text{mL}$
点滴後24時間	

本実験の結果は約1時間のPPACKの静脈内投与は、ヒヒの該動脈中に外科的動脈内膜切除術によって作られた重症の損傷部位における血小板沈着を永続的に阻害することを示している。これらの知見はまた、パートAにおける知見と同様に、1時間の

した。

第5図に示すように、PPACKの投与はヘパリンよりも有意に良好に透析器の容量損失を阻害した。

B. 体重が9ないし13kgの幼年オスヒヒでの別の実験において、各動物は長期大腸部「スクリプナー型」動脈シラステック吻合を受けた。本永続性吻合システムは検出可能な血小板若しくは凝血の活性化はもたらさない (ハーカーら、ジャーナルオブクリニカルインベスティゲーション、64巻、第559-69頁、1979年; 及びハンソンら、トロンボシスアンドヘモスタシス、58 (3) 巻、第801-805頁、1987年)。ヘマトクリット ($33 \pm 1.6\%$)、白血球数 ($14 \pm 2 \times 10^3 / \mu\text{L}$) 及びフィブリノーゲン濃度 ($403 \pm 23 \text{ mg/dL}$) は、使用した動物において全て正常であった。低ヘマトクリット、WBC増加、吻合血流不全若しくは局所的炎症を伴う動物は該実験から除外した。

各動物は4回実験に使用された。同じ動物について2回の2時間のPPACK曝露 (exposure) を2回の2時間のヘパリン抗凝血作用の循環と比較した。各循環の間、該吻合からの連続的血流をドップラー超音波流量計 (エルアンドエムエレクトロニクス1012型、ディリシシティ、カリフォルニア州) により測定した。血流速度は180ないし250 mL/分の範囲であった。

キュプロファン中空線維型の中空線維透析器 (トラベノールCP1211、ディアフィールド、イリノイ州、米国) を使用した。各透析器は同じ動物で同じ抗凝血剤について別々に2回ずつ使用した。該血液透析器の各使用前及びオーバーナイトの存在中、各透析器ユニット (セル) は滅菌標準生理食塩水で満たした。再使用に際して該透析器は4℃で約12ないし約18時間オーバーナ

イトで保存した。血液循環中、透析物チャンパーは減菌等張性生理食塩水で満たされており、排水口には栓をした。医療用シリコンゴム管、内径3.0mm、(ダウコーニング社、ミッドランド、ミシガン州)、及び隔壁テフロン管、長さ2cm、をその後透析器を該吻合に接続するために使用した。

透析器線維容積を、線維血性閉塞の尺度として各使用の前後に測定した(ゴッチら、トランザクションズ オブ アメリカンソサイエティ フォー アーティフィシャル インターナル オーガニズ、1989年、第87-96頁)。従って、各使用前に、該セルを等張性生理食塩水で満たし、目に見える気泡は全て該線維管から洗い出した。バルブ付圧力計を該動脈圧力調整槽(ヘッダー)に取り付け、45トルで1分間空気を流すことにより、該セルの水容積はその後該動脈圧力調整槽から容積測定容器中に自動的に回復した。各時間について2回測定を行ない、平均値を取った。

PPACK若しくは標準ヘパリン(豚腸粘膜由来、インベックス研究所、チャグリン フォールズ、オハイオ州)を、該透析器にごく近接した該血管吻合の該動脈枝中に注入した。該ヘパリン投与は透析器導入の5分前に100U/kgの初回投与を行ない、その後ハーバードマイクロ点滴ポンプ(901型、ハーバード儀器株式会社)を用いて15U/kg/時の速度で2時間連続的に点滴した。PPACKは該透析器の該補綴表面上を血液が循環する以前の約15分間、及びその後循環中の2時間100naoL/kg/分の速度で連続的に点滴したが、安定状態レベルに達するまで約15分間の前点滴を要した。

中空線維容積の損失の測定に加えて、該透析器線維管中の血小板血性蓄積の程度をシンチレーションカメラ(ビッカー社、ノ-

スフォード、コネクティカット州)により、各使用直後に排水した該透析器中に残存する自己由来¹¹¹In-ラベル化血小板を映像化して測定した。自己由来ヒト血小板は¹¹¹In-オキシド(アマシャム社、アーリントン ハイッ、イリノイ州)でラベルし、該透析器を挿入する前に注射した(コッツェら、トロンボシス アンド ヘモスタシス、53巻、第404-07頁、1985年)。カウント/分(cpm)を与える“初回使用”の該透析器の映像を、該システムから血液を排出し、線維管容積の測定を完了した直後に取った。該残存¹¹¹In-血小板放射能を測定するために第2回使用の前に“再使用”透析器を映像化した。総血小板沈着をその後、該透析器cpmを該循環血液cpm/μlで割り、この比率に血液1μl中の血小板数を掛けて算出した。

血球数測定(血小板、白血球、及び赤血球)はJ. T. ベイカー-全血分析器810型(アレンタウン、ペンシルバニア州)を用いてEDTA2ナトリウム抗凝血全血について行なった(ハンソンら、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲーション、75巻、第1591-99頁、1985年;及びハンソンら、アーテリオスクレロシス、5巻、第595-603頁、1985年)。標準テンプレート出血時間は、ハーカーら、ニューイングランド ジャーナル オブ メディシン、287巻、第155-59頁、1972年、及びマルバスら、ブラッド、57巻、第736-40頁、1981年、に記載されている方式で前腕の毛をそった手の平の表面において測定した。出血時間は二回ずつ測定し、平均値を出した。市販のラジオイムノアッセイを血小板第4因子(PP4)(アボット研究所、ノースシカゴ、イリノイ州)、β-トロンボグロブリン(βTG)(アマシャム社、アーリントンハイッ、イリノイ州)、フィブリノゲン(PPA)(マ-

イクロUSA社、ニューヨーク、ニューヨーク州)及び活性化補体C3抗原(C3a)(アマシャム社)の血漿レベルを測定するために行なった。これらの血漿アッセイ用の血液サンプルは、実施例1の処置及びマルバスら、上記、及びハンソンら、アーテリオスクレロシス、5巻、第595-603頁、1985年、に記載されているように採取、処置及び測定した。活性化トロンボプラスチン時間(APTT)は標準法(活性化PTT剤、オルト ダイグナスティクス、ラリタイン、ニュージャージー州)を用いて行なった。線維計測計(フィブロシステム、ディビジョン オブ ベクトン アンド ディキンソン多元社、コックイスビル、マサチューセッツ州)を、R. ビッグス、人血の凝固、ヘモスタシス アンド トロンボシス、オックスフォード、ブラックスウェル科学、第657-750頁、1976年に記述されているように凝血終点の検出に使用した。フィブリノーゲンは、K. ジェイコブソンら、スカンジナビアン ジャーナル オブ クリニカル アンド ラボラトリー インベスティゲーション、7巻(増刊14号)、第9-54頁、1955年、に述べられている総凝血蛋白法により測定した。

ヘパリン及びPPACKの血漿活性レベルはそれぞれ3.8%クエン酸ナトリウム及びACD中に採取した血液サンプルにおいて測定した。サンプルは採取後即ちに遠心し(2000xg、5分)、回収血漿はアッセイまで凍結しておいた。ヘパリン及びPPACKの活性レベルは連続点滴の30分及び60分後に測定した。いくつかの実験においてはPPACKレベルを3部位、すなわち、i)全身性、ii)該透析器の隣接部位かつPPACK点滴部位の遠位、及びiii)該透析器の隣接遠位、について測定した。ヘパリン活性レベルは合成免疫基質(スタクロムヘパリン、スタゴ、フ

ランス)を用いてヘパリンの血漿抗Xa活性増強作用を測定することにより決定した(ティーエンら、トロンボリサーチ、10巻、第399-410頁、1977年)。PPACKレベルは標準トロンビン試験(ウシトロンビン、パーケーディビス、モリス ブレイズ、ニュージャージー州)を用いて抗トロンビン活性を測定することにより決定した。該結果は自己由来のヒトACD血漿について得られたPPACK換算曲線からμg/μlで変換された。

血小板凝集はクエン酸添加の濃血小板血漿(PPR)についてクロノログ血小板凝集計(ハーバークン、ペンシルバニア州)を用いて37℃におけるPPRの攪拌懸濁液中の光透過度の増加を記録することにより行なった。クエン酸濃度は0.12Mに一定に保たれ、PPRの血小板数は250,000血小板/μlに調整した。該結果はマルバスら、ブラッド、57巻、第736-40頁、1981年に報告されたようにコラーゲン(ホルモン-ケミイ、ミュンヘン)及びADP(シグマ ケミカル社、セントルイス、モンタナ州)によって誘導されるEC₅₀(50%最大凝集反応をもたらす作用物質濃度)により変化した。

ヘパリン及びPPACKの凝血に対する効果を比較するにあたり、該APTTを同等に延長させるような用量を選択した(表5)。ヘパリンにおいては、100U/kgの初回投与及びその後の15U/kg/時の速度の連続点滴(これは1.06±0.08U/kgの血漿レベルに相当する)による該透析器への血液循環期間中を通じて、全身血でのAPTTは199±18秒に延長された。PPACKにおいては、該透析器の近位に100naoL/kg/分の速度で点滴(これは1.52±0.08μg/μlの全身血漿レベルに相当する)した場合、静脈血でのAPTTは139±23秒に延長された。PPACKは血漿中のPPA、フィブリノーゲンのト

ロンビン開裂産物、のレベルの上昇を妨げたが、ヘパリンは妨げなかった(表5)。

表 5
ヘパリン及びPPACKの抗凝血作用の比較

血液測定	対照	ヘパリン	PPACK
APTT (秒)	34±1	199±18	139±23
APTT (単位/秒)	—	1.1±0.08	—
PPACK (μg/秒)	—	—	1.5±0.06
PPA (pmol/L)	6.2±0.68	9.2±3.1	1.8±0.20
フィブリノーゲン (mg/dL)	403±24	387±32	344±14.0

PPACKは透析器内に直接注入され、該種毒からの除去が迅速であったため、本薬剤の該装置内レベルは全身濃度よりも実質的に高かった(表5)。

表 6
全身レベルと比較した中空線維透析器直前
及び直後の血液中PPACK濃度

サンプル部位	血液中PPACK (μg/ml)	
	30	60
全身	1.4±0.40	1.6±0.50
透析器前	3.05±0.55	3.65±0.65
透析器後	3.9±0.50	4.1±1.20

て使用した(第8図)。ヘパリン処置動物は全試験時間についてDFVの有意かつ漸進的低下及び該線維束内の血小板蓄積の相反する増加を示した。対照的に、PPACK処置により該透析器内の血小板蓄積が著しく減少するとともにDFVが保たれた。

透析器使用中の補体活性化(C3a)若しくは白血球数減少に関してヘパリン及びPPACK治療の間に明白な差は見られなかった。C3aレベルは769±202ng/mlの対照値から、ヘパリン及びPPACKのそれぞれについて2005±728ng/ml及び1989±360ng/mlのピークレベルまで上昇した。逆に、白血球数には対照値からの早期の低下が観察された(14,100±1,000細胞/μlからヘパリンが6,200±860細胞/μl、PPACKが5,900±810細胞/μl)。

本実験結果及びバートAの結果はヘパリンによる抗凝血対照実験の知見とは対照的に血液透析中の合成抗トロンビン剤PPACKの点滴が血小板依存性血栓形成及びその結果生じる該血液透析器中の中空線維束容積の損失を、著しく減少させることを明らかにしている。さらに、インビルの血栓形成の他の間接的血液指標、すなわち血漿PP4、βTG及びFPAは、ヘパリン療法中に観察されたレベルの上昇とは対照的にPPACK注入後も基準レベルを維持した。PPACKはまた、エクシビルのコラーゲン若しくはADPによって誘導される血小板凝集の測定値を変化させず、出血時間の延長によって示される血小板の止血プラグ形成を阻害したが、ヘパリンは阻害しなかった。これらの結果は、透析器中空線維の漸進的損失が血小板依存性で、トロンビンが介在する閉塞性血栓形成過程であることの証拠を提供するものである。

中空線維透析器による血液透析は米国では長期継続透析を受ける尿毒症患者に用いられている。透析器再利用における細菌の保

血小板反応性を全血血小板数、出血時間、血小板凝集、及び血小板特異性α顆粒蛋白βTG及びPP4を比較することにより評価した(表7)。血小板数はヘパリン若しくはPPACKの投与期間中の透析器通過中に有意に変化しなかったが、血小板止血作用に関しては有意の差が明らかになった。PPACKは出血時間を著しく延長し、PP4及びβTGの血小板から血漿中への放出を減少させた。ヘパリンはこれらの測定値のいずれにも影響を及ぼさなかった(表7)。100nmol/kg/分のPPACKを投与された5匹の別々の動物について行なわれたADP若しくはコラーゲンによる血小板凝集は本質的に正常であった(表7)。

表 7

血小板におけるヘパリン及びPPACKの作用

測定	対照	ヘパリン	PPACK	差
血小板数 (×10 ⁹ /μL)	449±90	420±28	401±17	>0.5
出血時間 (分)	4.5±0.4	6.7±1.2	24.8±1.9	>0.001
血漿PP4 (ng/ml)	8.2±1.0	20.7±6.8	4.5±0.7	<0.01
βTG (ng/ml)	13.5±2.4	23.7±6.6	11.5±5.7	<0.01
血小板凝集(BC ₅₀) ADP (μmol/L)	2.35	—	2.8	
ADP (μg/ml)	1.9	—	3.15	

透析器線維束容積(DFV)及び該線維束内の¹¹¹In-血小板比着を各使用後の該透析器中の血栓形成の独立の測定項目とし

存は、経済的理由からのみならず、装置の再利用に伴ない死亡率及び罹病率が低下することを示している最近の疫学研究的観点からも重要とみなされるようになっている(ボクラ、プロシーディングス オブ カウンセル ダイアリティック トランス プラント、10巻、第92-9頁、1980年)。しかしながら、ヘパリンによる凝血防止にもかかわらず、該透析器の人工表面への血液の接触は補体、血小板及び凝血を活性化させ、その結果一過性の肝中球減少、血栓形成及び、DFV及びそれに続く透析器輸送能力の漸進的損失をもたらす(ケノウィズら、アーティフィシャル オーガニズ、11巻、第155-62頁、1987年; B. ザルツマン、フェデラル プロシーディングス、30巻、第1503-09頁、1971年; 及びブローマンら、フェデラル プロシーディングス、30巻、第1494-502頁、1971年)。さらに、血液-表面相互作用の結果として生じる活性化及び/又は開裂産物は血圧低下及び呼吸障害等の不都合な全身作用をもたらしかねない(ヘンダーソンら、ブラッド ビュリフィケーション、1巻、第3-8頁、1985年; 及びダンジラダスら、キドニーインターナショナル (Kidney Int.), 1巻、第190-96頁、1972年)。ヘパリン使用に伴う他の副作用には骨修復時の異常出血(特に腎臓部及び頭蓋内部) [リンドセイラ、ランセット、2巻、第1287-90頁、1972年; ダンジラダスら、キドニーインターナショナル (Kidney Int.), 1巻、第190-96頁、1972年]、とヘパリン誘導性血小板減少症(サイネスら、ニューイングランド ジャーナル オブメディスン、303巻、第788-95頁、1980年)、及びともすれば重症の脱石灰質性骨疾患が含まれる(スクウィアズら、JAMA、241巻、第2417-18頁、1979年; 及びJ. グロウキ、

本発明の真の意図及び範囲からはずれることなく多数の變化及び改良を行なってもよい。

ライフサイエンス、33巻、第1019-24頁、1983年)。さらに、透析の終了時にヘパリン抗凝血作用を取り消すために投与されるプロタミンもまた、血圧降下及び補体放出等の問題をもたらす(アンダーソンら、サージェリィ、46巻、第1050頁、1959年、及びP. G. ルーブサー、テキサス ハート ジャーナル、14巻、第369-73頁、1987年)。時折、市販のヘパリンには、おそらく何らかの混入血小板活性化成分(類)の作用による動脈血栓症が伴うことがあった(ザルツマンら、ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲイション、65巻、第64-73頁、1980年)。

P P A C Kはその分子サイズの小ささゆえに腎臓から(T_{1/2}除去速度:3分以内、コレンら、ジャーナル オブ ラボラトリイ アンド クリニカル メディシン、98巻、第76-83頁、1982年)及びおそらく透析膜を通しての両方により迅速に除去されるため、全身性の抗止血作用はほとんどあるいは全くなしに、透析器内に局所的に抗血栓レベルを維持することが可能である。たとえば、本実験では100 mg/kg/分を投与した際の、該透析器中の血漿抗凝血活性の測定値は、全身レベルと比較すると著しく上昇した(表7)。実際の透析条件下では、P P A C Kも透析液体に除去されるため、この差はさらに顕著になると思われる。このように、結果として生じる止血の困難はヘパリンと比較するとごく小さい。ヘパリンは完全に安全若しくは有効というわけではないが、適当な代替品が得られなかったため、透析患者に使用され続けている。本発明は従って、血液透析を実施する際の改善された方法を提供するものである。

前記の内容は本発明の実例を示すことを意図しているが、限定するものではない。

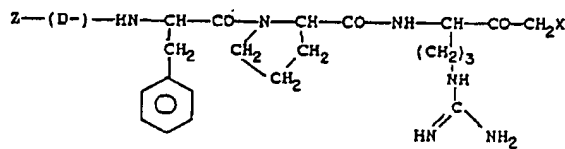


FIG. 1

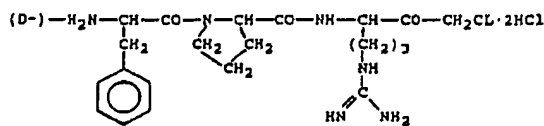
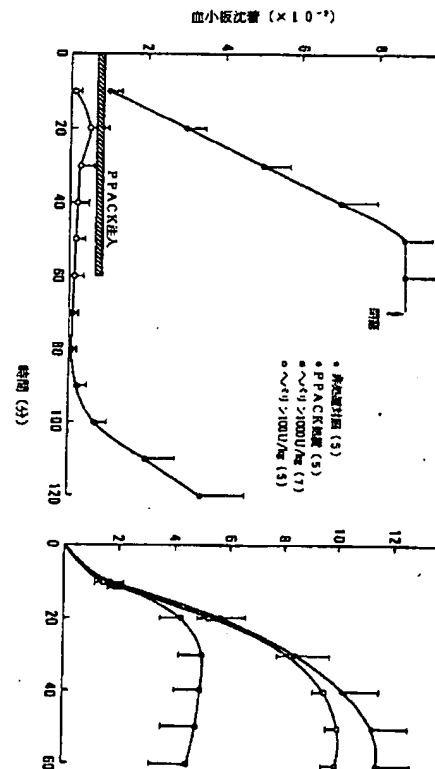
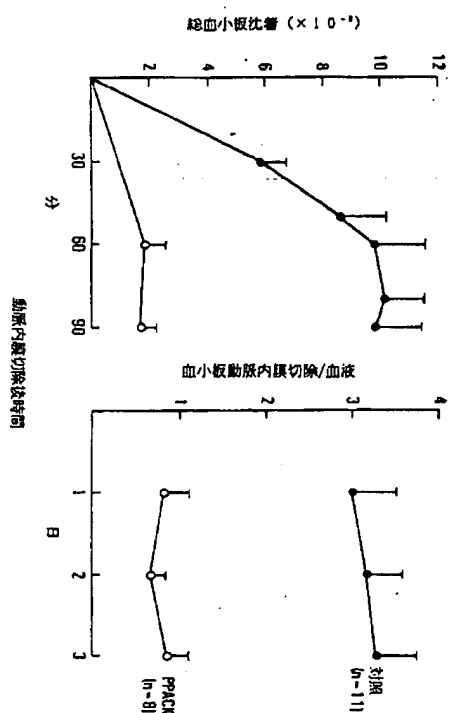
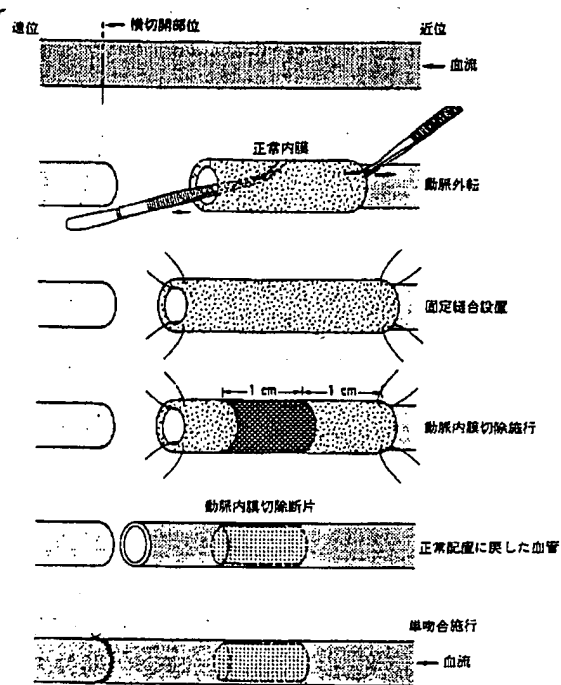
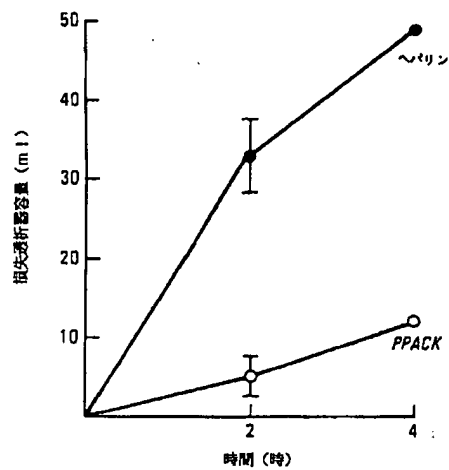
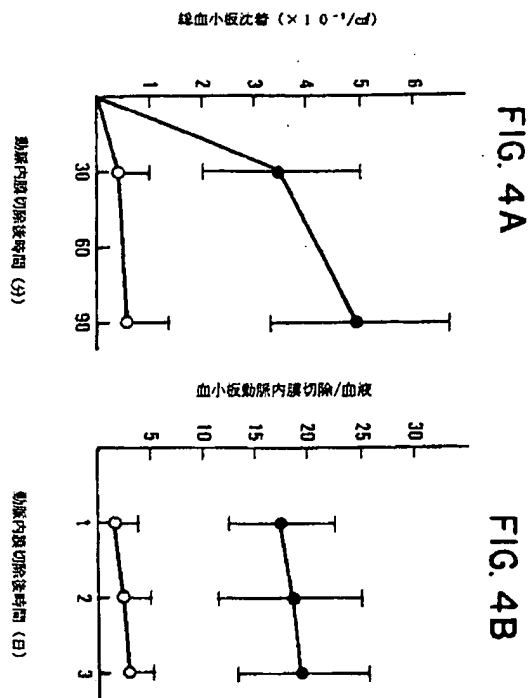


FIG. 2





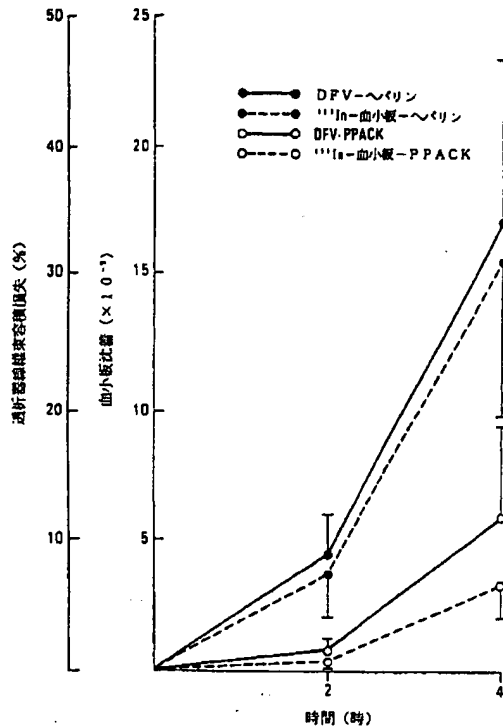


FIG. 8

1. CLASSIFICATION OF THE PCT ENTRY IN ACCORD WITH THE PCT CLASSIFICATION SYSTEM		17
A. CLASSIFICATION OF THE PCT ENTRY IN ACCORD WITH THE PCT CLASSIFICATION SYSTEM		
IPC(4): A61K 37/02; C07K 5/08		
U.S. CL. 1 530/331; 516/18		
II. PUBLICATION DATA		
Classification System: International Classification System I		
Classification Symbols: U.S. 530/331 516/18		
Documentation Sources: Where the International Classification System is used, the symbols for the classification system are indicated in the field of the International Classification System.		
III. DOCUMENTS REFERENCED BY THE ENTRY		
Category	Content of Document, if such document, must be summarized, of the present document	Referenced in Class No.
X Y	US, A. 4,318,904 (BRAW) 09 March 1982 See entire document.	1-2 3-24
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Commencement of the International Search: 15 May 1989		Date of the Actual Commencement of the International Search: 17 MAY 1989
International Searching Authority: ISA/US		Signature of Authorizing Officer: LESTER L. LEE

第1頁の続き

優先権主張

②発明者

©1988年11月22日米国(US)©275,330

ハンソン スティーヴン アー
ル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92024 エンシニタス メド
ー ヴィスタ レーン 201

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成8年(1996)6月25日

【公表番号】特表平4-501848

【公表日】平成4年(1992)4月2日

【年通号数】

【出願番号】特願平1-503265

【国際特許分類第6版】

A61K 38/00 ABX

38/46 ACB

【F I】

A61K 37/02 ABX 9455-4C

37/54 ACB 9455-4C

手 続 補 正 書

7.11.16

平成 年 月 日

1. 請求の範囲を別紙の通り補正する。

2. 明細書第14頁17行及び19行の「アテロース」を各々「アテローム」と訂正する。

特許庁長官 清 川 佑 二 殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第503265号

2. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 スクリップス クリニック アンド リサーチ
ファウンデーション

3. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 8211-8741

氏 名 (5985) 弁護士 中 村 稔

4. 補正命令の日付 自 発

5. (本補正により請求の範囲に記載された請求項の数は合計「2」となりました。)

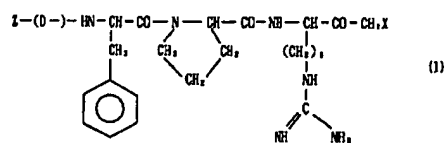
6. 補正の対象 明細書及び請求の範囲の欄

7. 補正の内容

中村 稔

請求の範囲

1. 下式(1)で表わされるペプチド又はその中性の医薬上許容される塩を含むことを特徴とする血小板依存性動脈血栓症を予防する医薬組成物。



(式中、Zは水素若しくはC₁-C₆アルキル基を示し、Xはハロゲン原子を示す)。

2. Xが塩素であり、Zが水素である請求の範囲第1項記載の組成物。